

Nachweis von antigentragenden Blutzellen einschließlich
Zellfragmenten in verschiedenen hergestellten humanen
Plasmen und ihre Bewertung für die immunologische
Verträglichkeit für den Plasmaaustausch bei TTP

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Karin Wurm

geboren am 05.02.1978 in Weißenburg / Bay

Gutachter

1. Prof. Dr. D. Barz
2. Prof. Dr. G. Wolf
3. Prof. Dr. O. Anders

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. April 2006

Abkürzungsverzeichnis

AABB	American Association of Blood Banks
Abb	Abbildung
ADAMTS13	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13
AK	Antikörper
APC	Autopheresis-C (<i>Zellseparator</i>)
BMB	Blow Molded Bowl (<i>Glocke</i>)
BK	Blutkomponenten
BSA	Bovine Serum Albumin
call	critical antigenic load of leucocytes
CD	Cluster of Differentiation
cill	critical immunological load of leucocytes
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CMV	Zytomegalie - Virus
CSP	Cryosupernatant - Plasma
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EBV	Ebstein - Barr - Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
et al	und andere
FC	Filter Core (<i>Glocke</i>)
FFP	Fresh Frozen Plasma (gefrorenes Frischplasma)
FNHTR	febrile nichthämolytische Transfusionsreaktion
GP	Glykoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HNA	Human Neutrophil Antigen
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPA	Human Platelet Antigen
HSC	High Separation Core (<i>Glocke</i>)
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
LST-1	Leucoflex (<i>Inline-Filter</i>)
Lz	Lymphozyten
MAIEA	Monoclonal Antibody Immobilization of Erythrocyte Antigen
MAIGA	Monoclonal Antibody Immobilization of Granulocyte Antigen
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen
MB	Methylenblau
MCS+	Mobile Collection System +
MKS	Multikomponentenspende
NaCl	isotonische Kochsalzlösung
nvCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PCS2	Plasma Collecting System 2
PI	Propidiumiodid
PLAS4	Plasmaflex (<i>Inline-Filter</i>)
PLT	Blutplättchen (Thrombozyten)
RBC	Red Blood Cells (Erythrozyten)
SD	Solvent-Detergent
Stabw	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TA-GvHD	transfusionsassoziierte Graft versus Host Disease
TBS	Tris Buffered Saline
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
TPE	Therapeutischer Plasmaaustausch
TR	Transfusionsreaktion
TRALI	transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
TRIM	transfusionsinduzierte Immunmodulation
TTP	Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura
VB	Vollblut
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	White Blood Cells (Leukozyten)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	01
2	Einleitung	03
2.1	Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura	03
2.2	Transfusionsreaktionen	05
2.3	Plasmen zur therapeutischen Anwendung	08
2.4	Qualitätskriterien von Plasma als Blutprodukt	09
2.5	Gewinnung von Plasmen zur therapeutischen Anwendung	09
2.5.1	Plasmagewinnung aus Vollblut	10
2.5.1.1	Inline-Filtration	11
2.5.2	Plasmagewinnung durch Zellseparatoren	12
2.5.2.1	Apheresesysteme mit Möglichkeit der Multikomponentenspende	12
2.5.2.2	Apheresesysteme der speziellen Plasmagewinnung	16
3	Zielstellung der Arbeit	18
4	Material und Methoden	19
4.1	Material	19
4.1.1	Reagenzien	19
4.1.2	Geräte	20
4.2	Methode des Immunoassay	21
4.2.1	Charakteristik der Antigene für die monoklonalen Antikörper ..	21
4.2.2	Herstellungsverfahren des Immunoassays	23
4.2.3	Messung der Proben mit dem Cell-Dyn 4000	25
4.3	Spender und Proben	27
4.3.1	Spenderauswahl	27
4.3.2	Probengewinnung	27
4.4	Statistik	29

5	Ergebnisse	30
5.1	Immunoassay	30
5.1.1	Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsverfahren	30
5.1.2	Abreicherung der Zellantigene	35
5.2	Cell-Dyn 4000	37
5.2.1	Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsverfahren	37
5.3	Einsatz des PLAS4 bei Apherese- und Vollblutplasma	41
6	Diskussion	44
7	Schlussfolgerungen	60
8	Literaturverzeichnis	61
9	Anhang	
9.1	Tabellenverzeichnis	
9.2	Abbildungsverzeichnis	
9.3	Danksagung	
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	

1 Zusammenfassung

Die Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine mikroangiopathische Erkrankung und führt ohne spezielle Behandlung in etwa 90% der Fälle innerhalb von 3 Monaten zum Tode. Heute sind zahlreiche Behandlungen mit therapeutischem Plasmaaustausch (TPE) zur Entfernung der großen pathogenen von-Willebrand-Faktor (vWF)-Multimere sowie möglicher Autoantikörper und die Zuführung der fehlenden Plasmafaktoren, speziell der vWF-cleaving-metalloproteinase, in Kombination mit Steroidgaben die Therapie der Wahl. Die Patienten benötigen hierfür häufig eine große Anzahl an allogenen Blutprodukten, insbesondere Plasmapräparaten, von einer Vielzahl an Spendern.

Diverse zellabhängige Nebenwirkungen und Komplikationen bei der Transfusion von Blutprodukten sind seit geraumer Zeit bekannt. Zur Erhöhung der Transfusions-sicherheit wurde hierfür 2001 in Deutschland die Leukozytendepletion von zellulären Blutkomponenten (BK) gesetzlich eingeführt. Man geht aber noch zum jetzigen Zeitpunkt vielfach davon aus, dass Blutplasma weitestgehend „zellfrei“ ist und zudem durch den Einfrier- und Auftauprozess bei der Herstellung noch vorhandene Restzellen letztendlich zerstört werden würden. Aus diesem Grund wurden Plasmapräparate bei dieser Regelung nicht einbezogen.

Es gibt in Deutschland aktuell verschiedene Methoden der Plasmagewinnung. Zum Einsatz kommen prinzipiell Quarantäneplasma aus der Einzelspenderherstellung und Solvent-Detergent (SD)-Plasma, ein speziell behandeltes und virusinaktiviertes Pool-Präparat.

Aus den zahlreichen Herstellungsverfahren resultieren letztlich unterschiedliche Plasmaqualitäten. Zur Vermeidung einer Immunisierung der Patienten, gerade bei Erkrankungen mit hohem Bedarf an Bluttransfusionen, ist neben der Infektionssicherheit und einem ausgewogenen Gerinnungspotential die Zell- und Zellfragmentfreiheit der Plasmen wesentlich. Im Plasma enthaltene Restzellen, aber auch Zellfragmente, spielen eine wichtige Rolle, da diese eine Reihe unerwünschter und schwerwiegender Nebenwirkungen und Komplikationen beim Empfänger hervorrufen könnten und somit auch für ein schlechtes Therapieansprechen sorgen.

In dieser Arbeit sollten Plasmapräparate aus unterschiedlichen Herstellungsverfahren auf ihren Gehalt an Restblutzellen und Zellfragmenten untersucht werden. Hierzu wurden Plasmen der Zellseparatoren Fresenius HemoCare COM.TEC, Dideco SpA Excel PRO, Gambro BCT Spectra, Gambro BCT Trima, Baxter Fenwal Autopheresis-C (APC) A200, Haemonetics MCS+/ Lathamglocke, - High-Separation-Core (HSC)-Glocke und - Filter Core (FC)-Glocke gewonnen. Desweiteren wurden Einzelspenderplasmen aus der Vollblutgewinnung mit den Inline-Filtern MacoPharma LST-1 für Vollblut (VB), MacoPharma PLAS4 für Plasma und kombinierter 2-fach Filtration mit LST-1 und PLAS4 herangezogen.

Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines Immunoassays nach dem Testprinzip des „Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen“ (MAIPA) unter Hilfe von monoklonalen Antikörpern (AK) (anti- β_2 -Mikroglobulin zum Nachweis von HLA-Kl. I, anti-CD61 von HPA, anti-CD44 von Erythrozyten und anti-CD16 von Granulozyten) und zum Vergleich dazu am Blutbildautomaten Cell-Dyn 4000 mit der Messung von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Blutplättchen (PLT).

Als Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich eindeutig, dass neben zellfreiem SD-Plasma, besonders inline-filtrierte Einzelspenderplasmen aus der Vollblutgewinnung sowie Aphereseplasmen mit zusätzlicher Membranfiltration weitestgehend zell- und zellmembranfrei sind und daher für den Einsatz als Austauschmedium bei TTP Eignung finden. Bei Aphereseplasmen mit ausschließlicher Separation durch Zentrifugation ohne jegliche zusätzliche Membranfiltration muss davon ausgegangen werden, dass viele dieser Plasmen durch verbliebene Restzellen und Zellfragmente ein genügend hohes immunogenes Potential beinhalten und damit für den Plasmaaustausch ungeeignet sind.

Nach den Untersuchungen und Resultaten dieser Arbeit muss auch die prinzipielle Deklaration von Blutplasma als „zellfrei“ kritisch überdacht werden.

Die Zell- und Zellfragmentfreiheit der Plasmen vermindert letztendlich nicht nur die Gefahr der Alloimmunisierung, einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) und anderer zellabhängiger Komplikationen beim Empfänger, sondern auch das Risiko der Übertragung von zellabhängigen Parasiten, Viren und Prionen.

Daher ist auch in Deutschland die WBC-Depletion für Blutplasma generell zu fordern.

2 Einleitung

Humanes Blutplasma ist ein weltweit in Kliniken häufig eingesetztes Blutprodukt, über dessen jeweilige Einsatzberechtigung oft kontroverse Diskussionen bestehen. Für bestimmte Indikationen ist die therapeutische Anwendung von Blutplasma jedoch allgemein anerkannt. Dazu gehören Massivblutungen, ein Mangel der Gerinnungsfaktoren V und XI, die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) abhängig von der gegebenen Verbrauchsdynamik, Notfallbehandlungen aufgrund einer komplexen Störung des Hämostasesystems sowie thrombotische Mikroangiopathien, wie die TTP und das Hämolytisch Urämisches Syndrom (HUS). Gerade die TTP ist eine Erkrankung, bei der der therapeutische Einsatz von Plasmapräparaten entscheidend zu deren Behandlung im Vordergrund steht.

2.1 Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura

Die TTP wurde erstmalig von Eli Moschcowitz beschrieben [Moschcowitz 1924]. Sie tritt heute mit einer Inzidenz von etwa 3,7 auf 1 Million Einwohner pro Jahr auf [Torok et al. 1995], wobei Frauen und jüngere Menschen zwischen 20-40 Jahren am häufigsten davon betroffen sind.

Pathogenetisch handelt es sich um eine mikroangiopathische hämolytische Anämie mit der Ausbildung von Fragmentozyten (Schistozyten) infolge weit verbreiteter hyaliner Mikrothromben, welche elektronenmikroskopisch aus degranulierten PLT mit wenig Fibrinogen oder Fibrin bestehen [Asada et al. 1985]. Charakteristisch sind die ausgeprägte Thrombozytopenie und die großen Multimere des vWF $>10 \times 10^6$ Da, die von den Endothelzellen (Weibel-Palade-Körperchen) und den PLT (α -Granula) gebildet werden. Diese hochmolekularen Multimere haben einen wesentlich stärkeren Effekt bei der primären Hämostase und führen durch die erhöhte Bindungsaffinität zu den Glykoproteinen (GP) Ib und IIb-IIIa, besonders bei erhöhtem Scherstress, zum Plättchenklumpen und bedingen dadurch den großen Verbrauch an PLT. Eine wechselnde neurologische Symptomatik, renale Funktionsstörungen,

abdominelle Beschwerden sowie Fieber sind krankheitstypisch und lassen sich weitestgehend als Konsequenz des mikroangiopathischen Prozesses erklären. Ohne spezifische Behandlung führt die TTP innerhalb der ersten 3 Monate in etwa 90% der Fälle zum Tode. Die Pathogenese wird durch einen Mangel an vWF-cleaving-metalloproteinase bestimmt, der entweder genetisch nach *Levy et al. 2001* durch Punktmutationen beim Chromosom 9q34 im ADAMTS13-Gen determiniert ist (Synonym: Upshaw-Schulman Syndrom) oder durch das Auftreten von Protease-inhibitoren, meist IgG, erworben wurde [*Furlan et al. 1998, Tsai und Lian 1998*]. Die ausbleibende oder verminderte enzymatische Spaltung der großen vWF-Multimere durch die Protease, die sonst normal innerhalb von Sekunden an der Oberfläche von Endothelzellen stattfindet [*Dong et al. 2002*], bedingt schließlich deren starkes Auftreten. *Jimenez et al.* beschrieben 2003 den Einfluss von endothelialer Apoptose und deren Mikropartikel bei der Pathogenese der TTP sowie die Rolle der endothelialen Zellaktivierung mit dem Ergebnis von intravaskulärer PLT-Adhäsion, -Aggregation und Thrombenbildung in den Mikrovesikeln.

Die Ätiologie der Erkrankung ist in den meisten Fällen idiopathisch. Immunologische Prozesse wie z.B. Autoantikörper gegen PLT, Endothelzellen oder der vWF-cleaving-metalloproteinase können neben Infekten (z.B. durch *E. coli*), Medikamenten (z.B. Ticlopidin), Entzündungen, Schwangerschaft, hormoneller Kontrazeption, Malignomen, Knochenmarktransplantation (KMT), Chemotherapeutika und primärer Endothelschäden eine wichtige auslösende Rolle spielen.

Die Symptomatik kann akut in Form einer Einzelepisode, intermittierend mit irregulären Episoden oder chronisch mit häufigen Rückfällen oft schon innerhalb weniger Wochen auftreten. Die Rückfallquote liegt zwischen 30 und 60%. Durch moderne Therapiekonzepte konnte die Mortalität inzwischen auf 10-20% gesenkt werden [*Myers 2002*]. Allerdings liegt möglicherweise die tatsächliche Mortalität doch deutlich höher, da die meisten Todesfälle schon innerhalb von 48h nach Ausbruch, oft noch vor der definitiven Diagnosestellung, eintreten [*Brailey et al. 1999*]. Zahlreiche Behandlungen mit TPE zur Entfernung der großen pathogenen vWF-Multimere sowie möglicher Autoantikörper und die Zuführung der fehlenden Plasmafaktoren, speziell der vWF-cleaving-metalloproteinase, in Kombination mit Steroidgaben sind heute die Therapie der Wahl [*Rock et al. 1991*]. Hierfür werden zunächst täglich meist 30-40ml Plasma pro kg Körpergewicht ausgetauscht. Als Austauschmedium kommen in Deutschland Fresh Frozen Plasma (FFP),

Cryosupernatant-Plasma (CSP) oder SD-Plasma in großen Mengen zur Anwendung. Auf die Qualität der eingesetzten Plasmen, insbesondere auf deren „Zell- und Antigenfreiheit“, muss verstärkt Wert gelegt werden, um die sonst durch die längerfristige und plasmaintensive Therapie möglicherweise resultierenden Transfusionsreaktionen (TR) zu vermeiden.

2.2 Transfusionsreaktionen

Bei der Behandlung von Patienten mit Blutprodukten steht die Vermeidung von möglichen TR im Mittelpunkt des Interesses. *Eckstein* unterschied 2001 als Risiken der Bluttransfusion hämolytische-, febrile nichthämolytische- (FNHTR) und allergische bzw. anaphylaktische TR, Posttransfusionspurpura (PTP), TRALI, transfusionsassoziierte Graft-versus-Host-Disease (TA-GvHD), Massivtransfusion, Hypervolämie, Transfusionsembolie, Transfusionshäm siderose, transfusions-induzierte Immunmodulation (TRIM) und Übertragung von Infektionskrankheiten.

Die häufigste TR beim Einsatz von FFP ist die allergische Reaktion, die durch infundierte Plasmaproteine aus Antigen-AK -Interaktionen resultiert. Das Risiko pro transfundierter Einheit (E) Plasma liegt nach den Untersuchungen von *Reutter et al.* 2001 bei 1,37%. Besonders übertragene WBC von Spendern können unter dem Einfluss verschiedenster Zytokine eine Vielzahl von unerwünschten Nebenwirkungen beim Empfänger auslösen. Dazu gehören FNHTR, TRALI, TA-GvHD, TRIM, Alloimmunisierung gegen HLA (Human Leukocyte Antigen) und Übertragung leukozytenständiger Krankheitserreger. Eine Alloimmunisierung gegen erythrozytäre und thrombozytäre Antigene ist ebenfalls möglich.

FNHTRs beginnen nach 30min bis 2h mit einem Anstieg der Körpertemperatur um $>1^{\circ}\text{C}$, Kältegefühl und Schüttelfrost. Auslöser sind Allo-AK gegen WBC, PLT und Granulozyten, sowie im Plasma enthaltene Zytokine wie z.B. IL-1, TNF- α , IL-6 und -8. In 65% können lymphozytotoxische AK nachgewiesen werden. Die Schwellendosis ist sehr variabel zwischen $0,2\text{-}2,5 \times 10^9$ /l kontaminierende WBC [*Perkins et al.* 1966].

Die **TRALI** ist definiert als eine neue Episode einer akuten Lungeninsuffizienz, die innerhalb von 6h nach einer Transfusion auftritt und gilt heute als eine der häufigsten Ursachen für fatale Transfusionsreaktionen mit einer Mortalität von 6% [Popovsky und Moore 1985] bis 20% [Renaudier et al. 2004]. Für deren Pathogenese existieren aktuell zwei Modelle:

1. als primär AK-vermitteltes Ereignis: HLA-AK und granulozytäre AK führen zur Komplementaktivierung und nachfolgender Transmigration von Granulozyten ins Lungengewebe mit Ausschüttung von zytotoxischen Inhaltsstoffen. Diese immune Form der TRALI tritt hauptsächlich nach der Transfusion von FFP und TK mit einer Inzidenz von 1:5000 Transfusionen auf [Bux 2005]. Es sollen auch HLA-AK, die in-vitro eine WBC-Agglutination auslösen, eine TRALI verursachen können.
2. als 2-event Modell: Als 1. Ereignis gilt die klinische Kondition des Patienten, resultierend in pulmonaler Endothelaktivierung und neutrophiler Sequestration. Das 2. Ereignis ist dann die Transfusion von biologisch aktiven Substanzen (z.B. Lipide, Zytokine), die diese adhärennten polymorphnuklearen WBC aktiviert und schließlich in einem Endothelschaden, Kapillarleck und TRALI endet [Silliman et al. 2003, Toy et al. 2005]. Diese nicht immune TRALI tritt nach Bux 2005 meistens nach Transfusion von gelagerten TK und EK auf, da die „priming activity“ durch die biologisch aktiven Substanzen in frischen zellulären BK und azellulärem Plasma nicht präsent ist.

Erste Beschreibungen gehen bis in das Jahr 1951 durch Barnard zurück. Sie tritt nach Webert und Blajchman 2003 mit einer Inzidenz von 0,014-0,080% pro allogenen Blutprodukt auf und führt innerhalb von 1-6h zu Hustenreiz, Dyspnoe, Zyanose und Fieber. Auch Toy et al. berichteten 2005 für FFP eine Inzidenz von 1:7900 Präparaten.

Die **TA-GvHD** ist Folge eines Überlebens von T-Lymphozyten (T-Lz) des Spenders im Empfängerorganismus. Dort kommt es zu einer Gewebsschädigung und einer möglichen Panzytopenie. Aufgrund der hohen Mortalität (ca. 85%) ist die TA-GvHD sehr gefürchtet, wobei besonders immundefiziente und immunsupprimierte Patienten gefährdet sind. Tierexperimentelle Daten sprechen dafür, dass 10^7 lebensfähige Lz/l zur Auslösung ausreichen können.

Durch die Übertragung einer größeren Anzahl von löslichen und zellgebundenen Fremdantigenen kann eine **TRIM** ausgelöst werden. Infolge der immunen Down-

Regulation kann es einerseits zu einer erhöhten postoperativen Infektionsrate, einer Aktivierung von CMV- oder HIV-Infektionen und einer erhöhten Rückfallrate von Krebserkrankungen kommen, aber andererseits wurden auch ein verbessertes Transplantatüberleben und eine verminderte Rückfallrate von entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben [Vamvakas und Blajchman 2001].

Eine **Alloimmunisierung** entsteht durch AK-Bildung des Empfängers gegen Spenderantigene. In erster Linie sind hierbei HLA betroffen. Sie werden vom MHC (Major Histocompatibility Complex) verschlüsselt und in zwei Klassen eingeteilt. Die Kl. I-Antigene sind auf allen kernhaltigen Zellen und PLT nachzuweisen, während die Kl. II-Antigene nur von antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, B-Lz und aktivierten T-Lz exprimiert werden. Für die Auslösung einer Alloimmunisierung müssen beide Klassen auf einer Zelle vorhanden sein. PLT sind hingegen nur schwach immunogen, da sie nur Kl. I-Antigene exprimieren. Die Folge einer HLA-Alloimmunisierung kann auch eine PLT-Refraktärität des Empfängers sein. Ihre Häufigkeit nimmt ab, wenn weniger als $2,5-5 \times 10^8$ WBC/E übertragen werden. Dieser Grenzwert wird auch als call-Wert (critical antigenic load of leucocytes) bezeichnet. Da eine WBC-Depletion das Risiko für eine Alloimmunisierung deutlich reduzieren kann, versucht man einen Grenzwert für die Kontamination mit WBC unter Berücksichtigung individueller Schwankungen zu finden, unterhalb dessen eine Alloimmunisierung nicht mehr zu erwarten ist. Nach heutigem Kenntnisstand gilt der sogenannte cill-Wert (critical immunological load of leucocytes) von 1×10^6 WBC/E als Schwelle für die Auslösung von Alloimmunisierungen. Auch WBC-Fragmente könnten nach *Dijkstra-Tiekstra et al. 2004b* eine Alloimmunisierung auslösen.

Viren als **leukozytenständige Krankheitserreger** können über BK übertragen werden. Dabei gibt es einige, für die WBC der Hauptvektor bei der parenteralen Verbreitung ist. Das gilt z.B. für das Zytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und *Yersinia enterocolitica*. Die größte Bedeutung wird der CMV-Infektion zugemessen. Es werden dabei zwei Infektionsmechanismen angenommen, einerseits die direkte Virenübertragung und andererseits die Reaktivierung latenter CMV-Infektionen. Die AABB gibt $<5 \times 10^6$ WBC/E zur Prävention einer CMV-Infektion an. Nach dem Auftreten einer neuen Variante der **Creutzfeldt-Jakob-Krankheit** (nvCJD) beim Menschen 1996 in Großbritannien, wurde dort die ausschließliche Verwendung

von WBC-depletierten Blutprodukten und der Einsatz von möglichst ausschließlich importiertem Plasma angeordnet [Murphy 1999]. Es gibt Hinweise, dass B-Lz bei der Ausbreitung der Krankheit eine Rolle spielen und das infektiöse Agens durch WBC in Blutprodukten übertragen werden kann.

2.3 Plasmen zur therapeutischen Anwendung

Das **FFP** wird aus Einzelspenderplasmen gewonnen und muss seit 1995 nach der Testung auf vorgeschriebene Infektionsparameter tiefgefroren in Quarantäne gelagert werden. Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) hat 2003 die Quarantänezeit von vorher sechs auf jetzt vier Monate reduziert [Bundesanzeiger Nr. 60 vom 27.03.2003]. Das **SD-Plasma** wurde erstmals 1991 als standardisiertes virusinaktiviertes Transfusionsplasma eingeführt. Dieses Inaktivierungsverfahren wurde erstmals von Horowitz et al. 1985 beschrieben und später von Piet et al. 1990 und Sachse et al. 1991 modifiziert. Es wird aus 400l Poolplasma hergestellt und muss nicht quarantänegelagert werden, da hier ein spezielles Virusinaktivierungsverfahren zur Anwendung kommt. Zahlreiche Filterungsschritte sorgen letztlich für eine Zellfreiheit dieser Plasmen.

Die Methode zur Herstellung des **Methylenblau (MB)-Plasma** wurde 1991 entwickelt [Lambrecht et al. 1991]. Das aus Einzelspenden gewonnene Plasma wird zunächst tiefgefroren, um notwendige Zellaufbrüche zu erhalten [Hellstern und Haubelt 2002]. Nach dem Auftauen erfolgt die photodynamische Behandlung mit MB zur Inaktivierung intrazellulärer Viren. Es erfolgt keine zusätzliche Zellreduktion. In Deutschland wurde dieses Verfahren 1999 vom PEI aufgrund seiner potentiellen Mutagenität nicht zugelassen.

Ein spezifisches Plasmapräparat ist **CSP**, das durch die Entfernung des Cryopräzipitates entsteht. Die Gewinnung dessen erfolgt durch Zentrifugation von angetautem Plasma bei 2-6°C. Man erhält dadurch den Plasmaüberstand, der u.a. auch einen deutlich verminderten Gehalt der großen Multimere des vWF besitzt.

2.4 Qualitätskriterien von Plasma als Blutprodukt

Für den bestmöglichen und ausgeglichenen Gehalt an Gerinnungsfaktoren und deren Inaktivatoren wird das gewonnene Frischplasma innerhalb von 6-8 Stunden, jedoch nicht später als 18 Stunden schockgefroren und dann bei mindestens -30°C gelagert [*Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten 2003*]. Eine Aktivierung der Gerinnung beim Einfrierprozess kann weitestgehend durch die angestrebte Zellfreiheit der Plasmen vermieden werden.

Nach den „*Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)*“ in der Fassung von 2003 gelten folgende Zellgrenzwerte und Qualitätskriterien:

- WBC <0,5 x10⁹/l
- PLT <20 x10⁹/l
- RBC <6 x10⁹/l
- Visuelle Kontrolle: unversehrt, keine sichtbaren Ausfällungen
- Sterilität

2.5 Gewinnung von Plasmen zur therapeutischen Anwendung

Die Herstellung von BK und damit auch Blutplasma unterliegt in Deutschland dem Arzneimittelgesetz. Zusätzlich wurden 1998 wesentliche Punkte der Gewinnung und Anwendung von BK in einem *Transfusionsgesetz* geregelt. Fachliche Fragen der Gewinnung und der klinischen Anwendung von Blutprodukten, die ständig dem Stand von Wissenschaft und Technik angepasst werden müssen, unterliegen der jeweiligen aktuellen Fassung der „*Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)*“. Empfehlungen zur Indikationsstellung von BK werden in den „*Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*“ gemacht.

Die Ressource für die Gewinnung von Blutprodukten sind freiwillige und gesunde Blutspender.

Mit der Möglichkeit, BK im geschlossenen System herzustellen und dem Patienten gezielt nur die Blutbestandteile zuzuführen, die er benötigt, hat sich die Transfusionstherapie in den letzten 50 Jahren von der Vollbluttransfusion zur „Hämotherapie nach Maß“ grundsätzlich gewandelt [Mueller-Eckhardt 1996]. Blutplasma kann prinzipiell aus antikoagulierten Vollblutspenden oder durch maschinelle Plasmapherese gewonnen werden.

2.5.1 Plasmagewinnung aus Vollblut

Die älteste und einfachste Art der Aufarbeitung von VB ist die Auftrennung durch Zentrifugation im 2-fach-Beutelsystem. Heute kommt meist ein 4-fach-Beutelsystem mit integriertem WBC-Reduktionsfilter (B) als so genannte „inline-Filtration“ zur Anwendung (Abb.1). Die Trennung der einzelnen Komponenten nach der Zentrifugation erfolgt maschinell durch einen BK-Extraktor, der mit dosiertem Druck auf den Beutel (C) und optischen Sensoren zur Gewinnung von PLT-armem Plasma (D) und einem buffy coat-armen Erythrozytenkonzentrat (EK) (E) führt.

Es gibt auch Verfahrensweisen, die stattdessen die einzelnen BK erst nach der Auftrennung separat als letzten Schritt der Herstellung filtern. In Abhängigkeit vom Hämatokrit des Spenders gewinnt man bei diesem Verfahren bis zu 250ml Plasma.

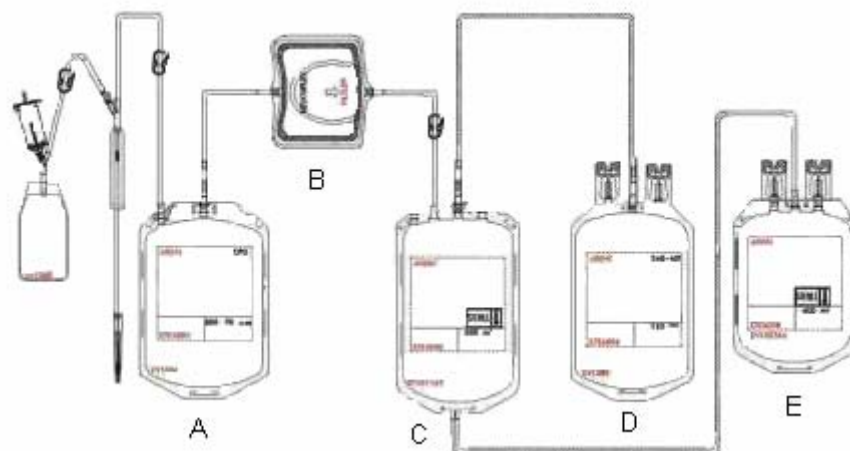


Abbildung 1: 4-fach Beutelsystem mit integriertem WBC-Reduktionsfilter

2.5.1.1 Inline-Filtration

Eine Möglichkeit zur Abreicherung von WBC ist neben Differentialzentrifugation, Sedimentation oder Waschschritten die „Inline-Filtration“ im geschlossenen System, die eine Reduktion von bis zu 5 Logstufen gestattet.

Der Filtrationsmechanismus ist im Wesentlichen ein mechanischer Siebeffekt. Die Adhäsion der WBC an die Fasern durch elektrostatische Wechselwirkungen und die Adhäsion von WBC an bereits adhärenenten PLT verstärken diesen Siebeffekt *[Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004]*.

Die beiden nachfolgend genannten Filter standen uns für die WBC-Reduktion zur Verfügung:

- Leucoflex (LST-1)
- Plasmaflex (PLAS4)

Leucoflex (LST-1) – Filter

Der LST-1 ist ein kombinierter Membran-/Tiefenfilter und wird zur WBC-Depletion von VB eingesetzt. Die Filterlagenstruktur des Vor- und Nachfilters besteht aus jeweils 2 Lagen Polyester und bildet ein Sieb mit einer Porengröße von ca. 40µm zur Filtration von Mikrokoageln. Die 22 Zwischenlagen sind aus Polypropylen und bilden einen Tiefenfilter, der durch seine „ungeordnete“ Faserstruktur die Adhäsion der WBC möglich macht und erst in der Tiefe, mit Anzahl der Lagen, den optimalen und hohen quantitativen Erfolg bringt.

Plasmaflex (PLAS4) – Filter

Der PLAS4 ist ein Membranfilter zur Filterung von Plasmaprodukten. Die Entfernung möglichst aller zellulären Bestandteile, sowie Zellbruchstücke und Mikroaggregate erfolgt durch einen Siebprozess bei einer einheitlichen Porengröße von 0,65µm. Der Filter ist zwischen zwei Folien aus PVC eingeschweißt und besteht aus insgesamt acht Lagen Filtermaterial mit einer vorderen und hinteren Lage aus Polyester und einer Membran aus PVDF (polyvinylidene difluoride), die in vier Lagen Polypropylen vorne und einer Lage dahinter eingebettet ist. Die Filteroberfläche ist ungeladen.

2.5.2 Plasmagewinnung durch Zellseparatoren

Ein anderes Prinzip zur Gewinnung von Plasmen ist die Plasmapherese mit dem Einsatz von Zellseparatoren. Damit können pro Sitzung bis zu 650ml Plasma von einem einzelnen Spender gewonnen werden. Die Auftrennung der BK erfolgt hierbei nach dem physikalischen Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation entsprechend der Svedberg-Gleichung. Zu Beginn der Zentrifugation wird die Zellsedimentation vor allem von der Größe der Zellen bestimmt. Daher sedimentieren WBC schneller als RBC und PLT. Wenn die Masse der RBC den Boden erreicht hat, werden das zwischen ihnen eingeschlossene Plasma und die WBC nach oben in die Schicht zwischen RBC und Plasma gedrängt. Die kleinen und langsam sedimentierenden PLT erreichen das Zellsediment zuletzt. Die endgültige Schichtung der Komponenten erfolgt letztlich entsprechend ihrer jeweiligen spezifischen Dichte (Tab.1). Eine entscheidende Rolle für die Gewinnung und Sammlung der verschiedenen BK spielen Zentrifugendurchmesser, -geschwindigkeit und -dauer.

Tabelle 1: Dichte und Größe der Blutbestandteile

	Mittlere Dichte in g/ml		Größe in µm
Plasma	1,026		
Thrombozyten	1,058	Thrombozyten	2 – 4
Monozyten	1,062	Erythrozyten	7 – 8
Lymphozyten	1,070	Lymphozyten	6 – 10
Granulozyten	1,082	Granulozyten	12 – 15
Erythrozyten	1,100	Monozyten	12 – 30

2.5.2.1 Apheresesysteme mit Möglichkeit der Multikomponentenspende (MKS)

Die MKS ist die parallele Gewinnung mehrerer verschiedener Blutpräparate von einem Spender mit Hilfe flexibler, automatischer Sammelverfahren. Einige Apheresesysteme erlauben es in einem einzigen Spendeverfahren, verschiedene Kombinationen von Thrombozytenkonzentraten (TK), EK und Plasmapräparaten zu sammeln. In unserem Institut wurde das Plasmaprodukt neben dem TK gewonnen.

Latham-Glocke (MCS+)

Die nach ihrem Erfinder Allan Jack Latham Jr., dem Gründer von Haemonetics, benannte Latham-Glocke ist eine Einweg-Kammer aus Polycarbon, die 1973 als erste dieser Art zur Blutverarbeitung auf den Markt kam. Diese Glocke wird in das Sammelgerät, z.B. MCS+ (Mobile Collection System), eingebracht und besteht aus einem fest stehenden Teil mit dem Zu- und Ablaufkanal und einem rotierenden Teil mit der Drehdichtung und Separationskammer. Das antikoagulierte VB wird über den Einlasskanal zum Glockenboden gepumpt und anschließend mit 4800 U/min zentrifugiert. Die schweren RBC sedimentieren an der Glockenwand, während das zuerst oben ankommende zellarme Plasma sowie die nachfolgende Schicht plättchenreichen Plasmas von optischen Sensoren gesteuert in die jeweiligen Sammelbeutel geleitet werden (Abb.2). Die BMB (Blow Molded Bowl) unterscheidet sich lediglich in ihrer Form und findet nur im Bereich der Plasmapherese Anwendung (Abb.3).

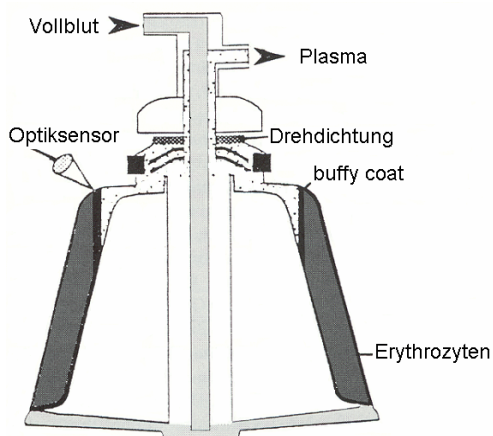


Abbildung 2: Latham-Glocke
[Mueller-Eckhardt und Kiefel 2004]

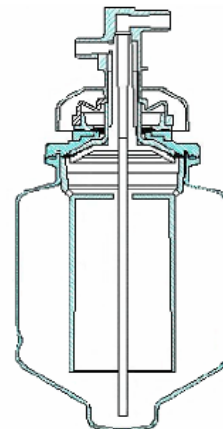


Abbildung 3: BMB
[Burnouf et al. 2003]

Spectra™ Apheresis System

Bei der Spectra handelt es sich um einen multifunktionellen Zellseparator, der seit 1988 sowohl zur therapeutischen Apherese als auch zur Sammlung von BK eingesetzt wird. Die Separationskammer besteht aus einem sich mit 2400 U/min rotierenden Einmal-Kunststoffring, der asymmetrische zweistufige Separationskanal teilt die Kammer durch einen Trenndamm in zwei separate Sektionen (Abb.4). In der

ersten Phase erfolgt die Abtrennung von RBC / WBC und plättchenreichem Plasma am Trenndamm. Die Zellen separieren über einer Breite von einem Drittel der Kammerzirkumferenz, wobei das Zellsediment aufgrund des Widerstandes am Damm entgegen dem Uhrzeigersinn zum Auslass und das plättchenreiche Plasma im Uhrzeigersinn zur Thrombozytensammelstelle wandert. Dort werden in einer zweiten Phase PLT und Plasma erneut separiert, wobei die PLT über eine zusätzliche WBC-Reduktionskammer abgeleitet werden und das plättchenarme Plasma weiter den stark an Radius abnehmenden Ringkanal entlang wandert. Das Plasma wird dann am weitesten zentral liegenden Wandabschnitt abgesaugt. Durch einen Kontrollschlauch kann man die korrekte Trennhöhe erkennen und ggf. durch Änderung der Pumpleistung oder Zentrifugationsgeschwindigkeit ändern.

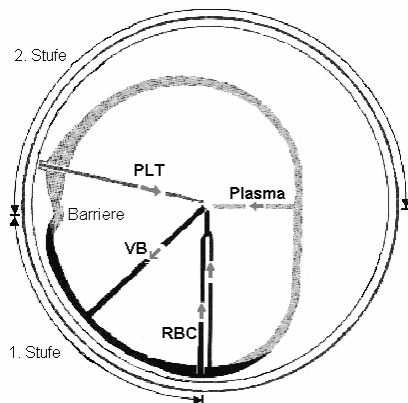


Abbildung 4: 2-stufige Sammelkammer der Spectra [Zeiler und Kretschmer 2000]



Abbildung 5: 2-stufige Trima Version 4 [Ringwald et al. 2003]

Trima® Automated Blood Collection System 4.03

Dieses System wurde 1997 zur vereinfachten und parallelen Gewinnung verschiedener BK eingeführt. Das Separationskonzept, der Kammernaufbau und das Material der Sets sind äquivalent zur Spectra, allerdings etwas kleiner (Abb.5).

Excel PRO

Der Zellseparator wird seit Anfang der 90'ger Jahre ähnlich der Spectra zur therapeutischen und präparativen Anwendung eingesetzt. Er verwendet auch eine

spezielle auswechselbare Zweistufentrennkammer (Abb.6). Die optische CCD-Kontrolle (Charge Coupled Device) reguliert und überwacht den buffy coat. Das VB gelangt in den ersten Teil der Trennkammer und wird dort durch Zentrifugation in seine Komponenten aufgetrennt. Die RBC und der buffy coat sammeln sich vor der Stufe an, während das Plasma und die PLT diese Stufe überwinden können.

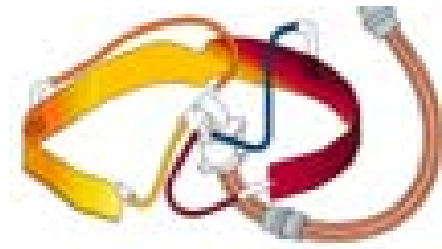


Abbildung 6: Trennkammer der Excel PRO

COM.TEC

Dieser ist einer der neuesten Zellseparatoren und arbeitet mit einer starren einstufigen C5-Kammer, die die Form einer progressiv-ansteigenden Spirale besitzt (Abb.7). Durch die Zentrifugation mit 2200 U/min kommt es zur Separation der Blutzellen und zum Aufbau einer Trenngrenze zwischen Zellsediment und Plasma. Dabei wird die Trenngrenze vom Gerät so eingestellt und optisch überwacht, dass die RBC und WBC einen Winkel im Kammerring, die sogenannte RBC-Barriere, nicht überwinden können. Das WBC-depletierte plättchenreiche Plasma kann den Winkel überwinden und wird in einer Ausbuchtung des Kammerrings vor dem Thrombozyten-Port konzentriert, wo dann das TK und PLT-arme Plasma entsteht.

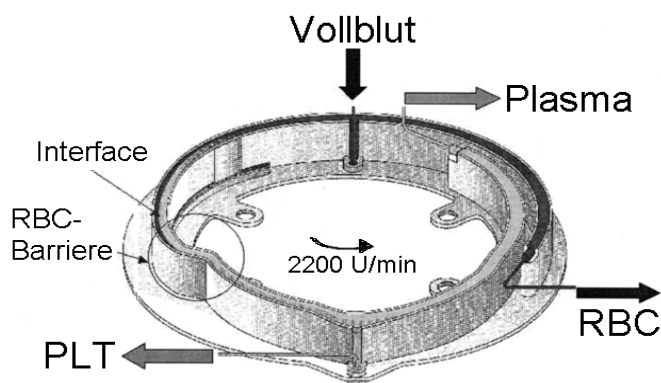


Abbildung 7: C5-Kammer der COM.TEC [Moog et al. 2003]

2.5.2.2 Apheresesysteme der speziellen Plasmagewinnung

Hier sind Zellseparatoren bzw. Glocken gemeint, die zur alleinigen Herstellung von Plasmaprodukten angewendet werden.

High - Separation - Core (HSC) – Glocke

Es handelt sich um eine Zentrifugenglocke, die erstmals 2002 in Deutschland eingeführt wurde und sowohl zur Herstellung von FFP als auch Industrieplasma eingesetzt wird. Sie besteht aus dem gleichen Material und Glockenkörper wie die BMB (Abb.8). Unterschiedlich sind die zweite Separationskammer im feststehenden Glockenkern sowie die veränderte Glockenschulter zur verbesserten Optikreferenzmessung und zuverlässigeren Erkennung der Plasma-Zell-Grenze. Durch den veränderten Glockenaufbau wird eine weitere Zellseparation an der Innenoberfläche des Außenkerns ermöglicht, was zu einem verminderten Zellgehalt im Plasma führt. Die Sedimentation findet bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 7500 U/min statt und sammelt zellarmes Plasma ohne den Gebrauch einer Filtermembran. Das um den Kern herum angesammelte Plasma wird hydrostatisch durch kleine Löcher in der äußeren Wand des Kernkörpers nach innen hingezogen.

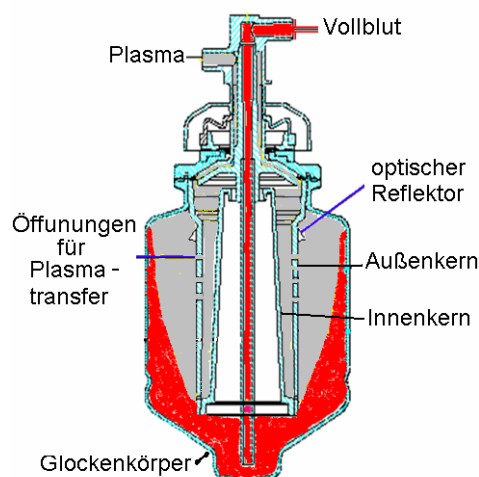


Abbildung 8: HSC-Glocke
[Burnouf et al. 2003]

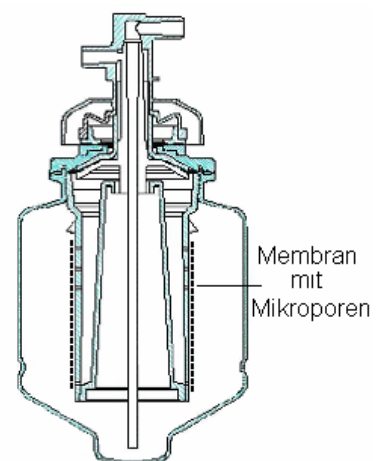


Abbildung 9: FC-Glocke
[Burkhardt et al. 2001]

Modernste Separationstechniken zur Gewinnung von Plasma kombinieren zur Auftrennung Zentrifugation und Filtration.

Filter Core (FC) – Glocke

Diese Glocke ist in ihrem Aufbau und Herstellungsprinzip der HSC-Glocke sehr ähnlich (Abb.9). Charakteristisch ist der modifizierte Glockenkern mit der außen am Glockenkern angebrachten Filtermembran mit einer Mikroporengröße von $1\mu\text{m}$. Die Separation erfolgt durch Zentrifugation. Die anschließende Filterung durch die Membranpassage reduziert die noch im Plasma verbliebenen Restzellen.

Autopheresis-C Plasmapheresis System, Model A-200

Der Zellseparator wurde 1986 zur Durchführung von präparativen Plasmapheresen eingeführt. Die Separation findet in einer rundlichen Kammer, dem Plasmacell-C[®], statt (Abb.10). Der spezielle Membranfilter besteht aus Nylon und weist eine Porengröße von $0,65\mu\text{m}$ auf. Nur dem Plasma ist es möglich, die sich mit 3600 U/min drehende Membran zu überwinden und in den Innenraum zu gelangen. Dort gelangt dieses über die Plasmakanäle zum Plasmaausgang am Boden der Kammer, während das Zellkonzentrat die Kammer über einen seitlichen Ausgang verlässt.

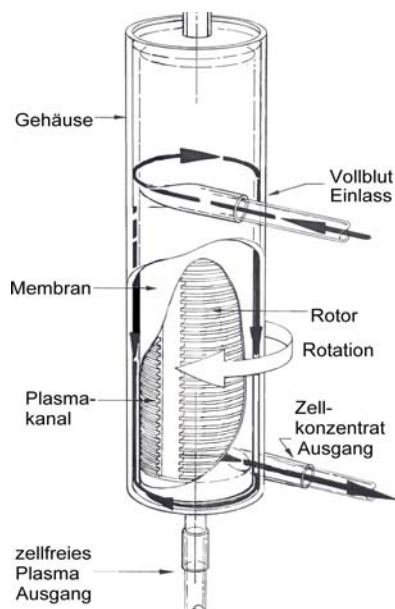


Abbildung 10: Plasmacell-C der A200

3 Zielstellung der Arbeit

In Deutschland ist seit dem 01.10.2001 die WBC-Depletion von zellulären Blutprodukten gesetzlich vorgeschrieben. Allerdings trifft diese Regelung nicht für Plasmapräparate zu. Man geht davon aus, dass in der Regel die Anzahl von WBC im Plasma weitaus geringer ist, als die in den *"Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) 2003"* festgelegten Obergrenze. Weiterhin soll durch den Einfrierprozess zur Quarantänelagerung die Zellzahl zusätzlich reduziert werden. Es fehlen derzeit spezifische Belege durch prospektive klinische Studien, dass die WBC-Depletion von Plasma einen positiven Effekt auf die Verminderung der Alloimmunisierung oder Verhinderung von Virusübertragungen und bakteriellen Infektionen hat [PEI, Bundesanzeiger 174 vom 14.09.2000].

Ziel dieser Arbeit ist es, Plasmen verschiedener Herstellungsverfahren hinsichtlich ihrer zellulären Kontamination, einschließlich der Berücksichtigung von Zellfragmenten, darzustellen und damit eine Aussage über transfusionsassoziierte Risiken und Nebenwirkungen zu treffen. Es stellt sich die Frage, ob Plasma nach den aktuellen Herstellungsrichtlinien zur therapeutischen Verwendung bezüglich oben genannter Gesichtspunkte geeignet ist und ob sich die verschiedenen Verfahren in ihrer Qualität diesbezüglich unterscheiden.

Gerade bei Krankheitsbildern wie TTP, die heute den unverzichtbaren Einsatz von zumeist enormen Mengen an Plasmapräparaten benötigen, ist dies von sehr großer Relevanz für die immunologische Verträglichkeit und damit letztlich für den therapeutischen Erfolg.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden für den Immunoassay verwendet:

Aqua destilliert

Anti-Human-Serum: monospezifisches IgG, Kaninchen, Titer 1:32, Ch.-B.:1K3324 (IMMUCOR, Rödermark, Deutschland)

Couling-Puffer: 1,59g Na_2CO_3
2,93g NaHCO_3
0,2g NaN_3
gelöst in 1 Liter destilliertem Wasser (pH 9,6)

Konjugatkonzentrat: Peroxidase-konjugiertes Ziege-Anti-Human-IgG, Fc, Fragment spezifisch, Antikörper reagiert mit schweren Ketten von Human-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland)
Verdünnung in Solubilisationspuffer auf 1:8000

Monoklonale

Maus-Antikörper:

- β_2 -Mikroglobulin, Cat No. 0114, Clone B1G6 (IMMUNOTECH, Marseille, France), 1:15 verdünnt
- CD 16, Cat No. 0813, Clone 3G8 (IMMUNOTECH, Marseille, France), 1:3 verdünnt
- CD 44, Cat No. 0845, Clone J-173 (IMMUNOTECH, Marseille, France), 1:15 verdünnt
- CD 61, Cat No. 0728, Clone PM6/13 (LINARIS, Wertheim, Deutschland), 1:15 verdünnt

NaCl 0,9%: physiologische isotonische Kochsalzlösung

PBS – BSA 2%: Phosphate buffered saline; Bovine serum albumin
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung wird 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt (pH 7,2) und Zugabe von BSA bis zu einer Endkonzentration von 2%
Dulbecco's PBS: (0,9 mM CaCl_2 , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 137 mM NaCl und 8,1 mM Na_2HPO_4)

Schwefelsäure: 2,5n H_2SO_4

<u>Solubilisations-Puffer:</u>	1,21g Tris in 950ml isotonischer Kochsalzlösung (pH 7,4) 5ml Triton X-100 isotonische Kochsalzlösung bis insgesamt 1 Liter
<u>Substrat (OPD):</u>	Code No. S 2045, pro Tablette 3,5mg-1,2phenylendiamin-Dihydrochlorid, (DAKO, Glostrup, Denmark)
<u>Testseren:</u>	Humane polyspezifische Testseren mit Anti-HLA bzw. Anti-HPA bzw. Anti-HNA
<u>TBS-Waschpuffer:</u>	Tris Buffered Saline (TBS) 1,21g Tris in 950 ml isotonischer Kochsalzlösung 5ml Triton X-100 0,5ml Tween ²⁰ 0,5ml 1M CaCl ₂ isotonische Kochsalzlösung bis auf 1000 ml aufgefüllt
<u>Wasserstoffperoxid:</u>	H ₂ O ₂
<u>Ziege-Anti-Maus-IgG:</u>	Fc, Fragment spezifisch, reagiert mit den schweren Ketten auf Maus-IgG, zum Beschichten der Mikrotiterplatten (Dianova, Hamburg, Deutschland)

4.1.2 Geräte

Folgende Geräte wurden genutzt:

<u>Blutbildautomat:</u>	Cell-Dyn 4000 (Abbott, Santa Clara, CA)
<u>Brutschrank:</u>	37°C
<u>EDTA-Röhrchen</u>	
<u>Kühlschrank:</u>	4°C
<u>Kühlzentrifuge:</u>	Centrifuge 5417 R, 14000 U/min, 4°C (EPPENDORF)
<u>Mikrotiterplatten:</u>	8x12 Vertiefungen
<u>Multipipette:</u>	12-fach
<u>Photometer:</u>	Spectra, 492nm (SLT Labinstrumente, Crailsheim, Deutschland) mit Computersoftware EASY-BASE Version 6.42
<u>Pipetten</u>	

Stoppuhr

Zentrifuge: Biofuge pico, 10000 U/min (HERAEUS) zur Zentrifugation der Eppendorf-Tubes

Zentrifuge: Rotina 35, 3000 U/min (HETTICH) zur Zentrifugation der EDTA-Blutröhrchen

4.2 Methode des Immunoassay

Um die Plasmaproben auf ihren Gehalt an bestimmten membrangebundenen Antigenstrukturen zu testen, wurde ein Immunoassay basierend auf dem Testprinzip des MAIPA herangezogen [nach Kiefel et al. 1987]. Durch den Zusatz von humanen multispezifischen Kontrollseren bzw. monospezifischem Anti-Human-Serum und spezifischen monoklonalen Maus-AK, die jeweils für das gleiche Protein spezifisch sind, jedoch ihre Epitope in verschiedenen Regionen des Proteins haben, konnten bestimmte Antigene der jeweiligen Blutzellmembranen differenziert werden (Tab.2).

Tabelle 2: Auswahl der monoklonalen Antikörper und Kontrollseren

Antigenstruktur	Monoklonale AK	Kontrollserum mit
Membrangeb. HLA-Kl. I	anti- β_2 -Mikroglobulin	anti-HLA
Thrombozyten	anti-CD61	anti-HPA-1a/1b
Erythrozyten	anti-CD44	anti-Human-IgG
Granulozyten	anti-CD16	anti-NA ₁ /NA ₂

4.2.1 Charakteristik der Antigene für die monoklonalen Antikörper

β_2 -Mikroglobulin: Das 12 kDa große Molekül ist nicht-kovalent mit den α -Ketten verbunden. Zusammen bilden sie den HLA-Kl. I-Komplex, welcher von vielen kernhaltigen Zellarten, wie z.B. Lz, PLT, Thymozyten, Monozyten, Granulozyten, Endothel- und Epithelzellen, exprimiert wird. Der Clone B1G6 ist spezifisch für

humanes β_2 -Mikroglobulin und erkennt den Komplex frei oder membranassoziiert. Das genaue Epitop für den AK konnte noch nicht gezeigt werden.

CD 61: Das Molekül wird von PLT, Megakaryozyten und Makrophagen exprimiert und verbindet sich mit CD41 (GP IIb) oder CD51 (Vitronectinrezeptor) auf der Zelloberfläche. Es ist ein GP in der β_3 -Untereinheit des Integrins mit einem Molekulargewicht von 105 kDa. CD61 ist ein Rezeptor für Fibrinogen, Fibronektin, vWF und Thrombospondin. Der Clone PM6/13 ist ein β_3 -spezifischer (GP IIIa/CD61) monoklonaler AK auf PLT-Membranen und inhibiert nach *Patel et al. 1998* bei funktionellen Studien die durch alle untersuchten Agonisten ausgelöste Aggregation der PLT.

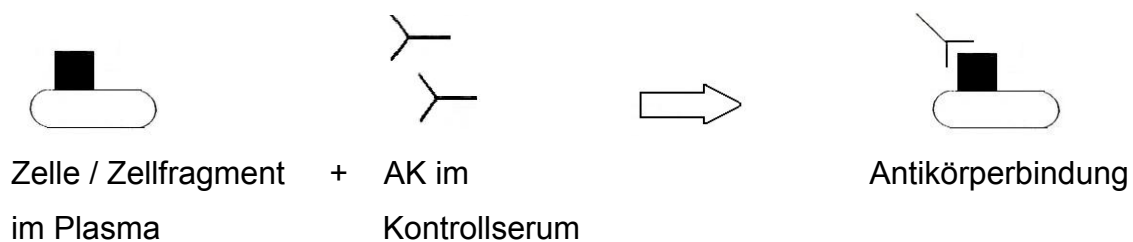
CD 44: andere Bezeichnung: Hermes-Antigen Pgp-1 (Phagocytic glycoprotein I) WBC und RBC exprimieren das 80-95 kDa große, transmembrane Molekül mit umfassenden Glykosylierungen. Dieses Molekül bindet Hyaluronsäure und vermittelt die Adhäsion der WBC. Bei den RBC ist es verantwortlich für das Blutgruppenantigen Indian (In a/b). Der Clone J-173 besitzt die antigene Spezifität des humanen CD44 / Pgp-1 [*Culty et al. 1990*].

CD 16: andere Bezeichnung: Fc γ R III

Das Antigen wird von neutrophilen Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen exprimiert und vermittelt die Phagozytose sowie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Es ist Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors, der Immunkomplexe aber nicht monomerisches IgG bindet. Der Rezeptor existiert in 2 Formen, eine transmembrane Form (Fc γ R IIIA, 50-60 kDa) und eine glycosylphosphatidylinositol-verankerte Form (Fc γ R IIIB, 48 kDa), die nur auf Neutrophilen exprimiert wird. Sie enthält auch die wichtigen NA₁- und NA₂-Antigene [*Huizinga et al. 1990*]. Der Clone 3G8 bindet beide Isoformen.

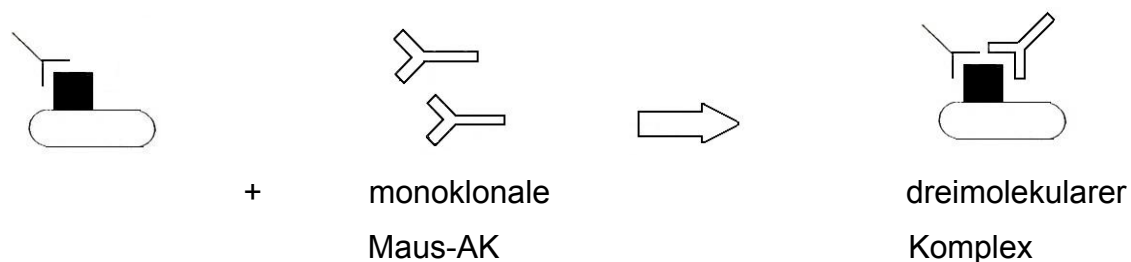
4.2.2 Herstellungsprotokoll des Immunoassays

Von jeder Plasmaprobe wurden jeweils 300µl in Eppendorf-Tubes gefüllt und anschließend für 2min bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Inkubation der eventuell vorhanden, abgelagerten Zellen bzw. Zellfragmente mit 30µl PBS-BSA-2% und 30µl des jeweiligen humanpositiven Kontrollserums für 30min bei 37°C.

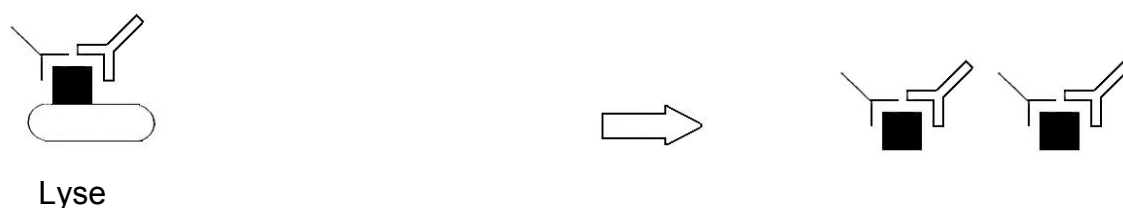


■ = Glykoprotein mit Bindungsstelle für AK

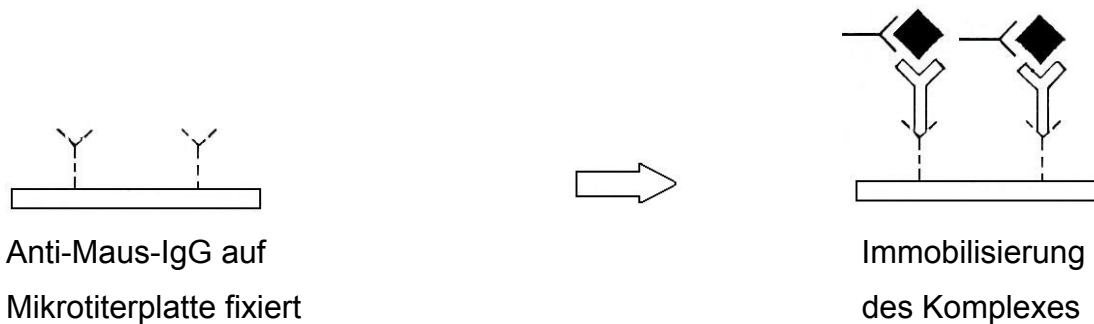
Nach Abwaschung der ungebundenen AK mit 100µl NaCl schloss sich die Zugabe von je 30µl PBS-BSA-2% und 10µl des antigen-spezifischen monoklonalen AK zu den entsprechenden Tubes und erneute Inkubation für 30min bei 37°C an.



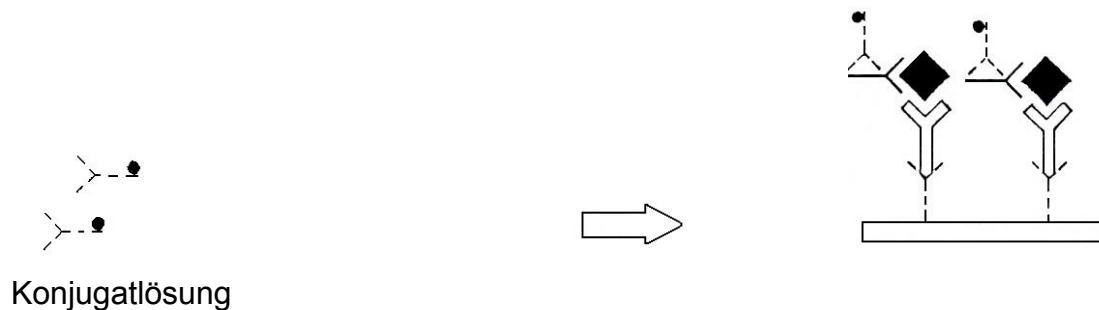
Nach gründlicher 3-maliger Waschung mit je 100µl NaCl und der Zugabe von 100µl Solubilisationspuffer fand wiederum eine 30-minütige Inkubation bei jetzt 4°C statt. Teilweise verblieben die Proben in dieser Phase auch über Nacht im Kühlschrank.



Zur Abtrennung großer, nicht gelöster Membranbestandteile zentrifugierten die Proben für 30min bei 14000 U/min und 4°C. Anschließend wurden vom Überstand jeweils 50µl in 200µl TBS-Puffer pipettiert, woraus dann je zweimal 100µl (Doppelansatz) in eine Mikrotiterplatte, welche vorher mit Ziege-Anti-Maus-IgG und Coupling-Puffer beschichtet worden war, gefüllt wurden.



Nach 90-minütiger Inkubation bei 4°C und 4-maliger Waschung mit je 200µl TBS-Puffer erfolgte die Zugabe von 100µl Konjugatlösung (peroxidase-markierte AK gegen humanes IgG).



Nach wiederum 120 Minuten Inkubation bei 4°C und 5-maligem Waschen mit je 200µl TBS-Puffer wurden 100µl der Substratlösung (4 OPD-Tabletten in 12ml Aqua dest. und 5µl H₂O₂) in die Vertiefungen eingefüllt. Die Platte inkubierte anschließend für 15 Minuten bei 22°C im Dunkeln. Die Zugabe von je 50µl 2,5n Schwefelsäure beendete die Reaktion. Es folgte die photometrische Messung der Extinktionen mit einem ELISA-Mikrotiter-Reader bei 492nm.

Die entsprechenden Resultate werden als ΔOD -Werte angegeben. Diese errechnen sich aus:

$$\Delta OD = OD_{\text{TEST}} - OD_{\text{BLANK}}$$

OD_{TEST} = Extinktion der Testansätze

OD_{BLANK} = Extinktion der Ansätze ohne zugegebenes Konjugat

Zur letztendlichen Auswertung gelangt das arithmetische Mittel aus dem jeweiligen Doppelansatz der Messungen.

Die Messung hat ein positives Ergebnis, wenn $\Delta OD > 0,200$ ist.

Dieser Wert von 0,200 ist keine feste Größe und wird in unserem Labor als Grenzwert für positive Extinktionen angegeben. Er ergibt sich aus der Addition von Plattenleerwert, individuellen Plasmen-Leerwerten, Laboreigenschaften und einer gewissen Sicherheitsspanne, um mit einer zuverlässigen Gewissheit von einem positiven Messergebnis ausgehen zu können.

4.2.3 Messung der Proben mit dem Cell-Dyn 4000

Sämtliche Plasmaproben wurden nach ihrer Gewinnung mit dem Cell-Dyn 4000 (Abbott, Santa Clara, CA) gemessen. Als Ansaugvolumen werden dafür je 112,5 μl Probenmaterial benötigt.

Der Cell-Dyn 4000 ist seit 1997 auf dem europäischen Markt. Es handelt sich um einen automatisch arbeitenden Blutbildautomaten, der die Methode der Durchflusszytometrie, zur optischen Messung mit Hilfe einer 4-winkeligen Argonionenlaserlicht-Streuung und 2-Farben-Fluoreszenz [Jones et al. 1998] sowie zur fokussierten elektrischen Widerstandsmessung (Impedanztechnik), als auch die Technologie der Absorptionsspektrometrie zur Hämoglobinbestimmung, nutzt.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Zählung und Erfassung der Eigenschaften von Zellen und Partikeln, die dafür in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert und damit einzeln hintereinander durch einen Messbereich transportiert werden.

Durch die optische Messung mit Hilfe von Streulicht und Fluoreszenz werden WBC, kernhaltige RBC, Retikulozyten und PLT bestimmt. Gleichzeitig erfolgt während der PLT-Zählung eine Messung der RBC zur Qualitätskontrolle der durch die Widerstandsmessung erfolgten RBC-Bestimmung. Hierzu wird ein Argonionenlaser mit einer Leistung von 10mW und einer Wellenlänge von 488nm verwendet. Wenn die Zellen mit dem Laserstrahl in Wechselwirkung treten, streuen sie das Laserlicht in alle Raumwinkel. Die Streulicht-Intensität bestimmter Zellarten ist in den einzelnen Winkelbereichen unterschiedlich. Die Vorwärtsstreuung dient vorrangig zur Messung der Zellgröße. Mit Hilfe der Seitwärtsstreuung werden Informationen über die Zelloberfläche und den inneren Aufbau der Zellen gesammelt. Dadurch erhält man u.a. das Differenzialblutbild der WBC. Mit Verwendung von Propidiumiodid (PI) kann der Argonlaser die DNA markierter Zellen zum Fluoreszieren bringen, wodurch die Bestimmung von kernhaltigen RBC, Retikulozyten und die Lebensfähigkeit der WBC möglich ist.

Durch elektrische Widerstandsmessung erfolgt die Zählung und Größenbestimmung der RBC sowie der Größenbestimmung der PLT. Gleichzeitig erfolgt die Zählung der PLT zur Qualitätskontrolle der durch die optische Messung bestimmten PLT-Zahl. Hier wird die Spannung aufgezeichnet, die für die Aufrechterhaltung eines konstanten Stromflusses durch die Messöffnung notwendig ist. Passiert eine Zelle als Nichtleiter die Öffnung, wird der Stromfluss unterbrochen und die Spannung steigt an. Durch Zählung der Spannungsimpulse erhält man die Zellzahl. Die Amplitude des Impulses ist abhängig vom Volumen des Partikels. Nach *Steele et al. 2001* ist der Gebrauch der optischen PLT- und WBC-Messung bei niedrigen Zellzahlen noch zuverlässiger als die PLT-Werte mit der Widerstandsmessung.

Interferierende Substanzen bei der WBC-Messung können lyse-resistente RBC und PLT-Klumpen, bei der RBC-Messung Auto- und Kälteagglutinine sowie bei der PLT-Messung PLT-Klumpen, WBC/RBC-Fragmente, mikrozytische RBC und Kälte-/Wärmeagglutinine sein.

4.3 Spender und Proben

4.3.1 Spenderauswahl

Zur Gewinnung der Vollblut- und Plasmaproben wurden sowohl Vollblutspender als auch Apheresespender rekrutiert. Die Auswahl der Spenderinnen und Spender erfolgte zufällig. Bei allen Spendern handelte es sich um gesunde, den „*Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)*“ in der Fassung 2003, entsprechende Blutspender.

Ein Votum der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde beantragt und liegt mit der Bearbeitungsnummer 1026-01/03 vor.

4.3.2 Probengewinnung

Von jedem Spender wurde jeweils ein EDTA-Röhrchen mit VB vor der jeweiligen Spende abgenommen. Für den Erhalt der Plasmafraktion wurden die EDTA-Röhrchen für 7min mit 3000 U/min zentrifugiert und danach der Plasmaüberstand gewonnen. Dieses Plasma galt für den Vergleich mit dem später produzierten Plasma als Ausgangsreferenz für den jeweiligen Spender und wird später als Ausgangsplasma bezeichnet.

Aphereseplasmen, nach alleiniger Auftrennung durch Zentrifugation, sind von der:

- Fresenius HemoCare / COM.TEC
- Dideco SpA / Excel PRO
- Haemonetics MCS+ / Lathamglocke
- Gambro BCT / Spectra
- Gambro BCT / Trima 4
- Haemonetics PCS2 / HSC-Glocke
- Gambro BCT / Trima 4 + MacoPharma / PLAS4 (+ inline-Filtration)

Aphereseplasmen, nach Zentrifugation und Membranfiltration, stammen von der:

- Baxter Fenwal / Autopheresis-C A200
- Haemonetics MCS+ / FC-Glocke

Plasmen, nach der Auftrennung von VB, wurden gefiltert mit dem:

- MacoPharma / Leucoflex LST-1
- MacoPharma / Plasmaflex PLAS4
- MacoPharma / LST-1 + PLAS4 (zweifache Filtration)

Die jeweilige Anzahl der pro Verfahren zur Verfügung gestandenen Plasmaproben zeigt Abb.11.

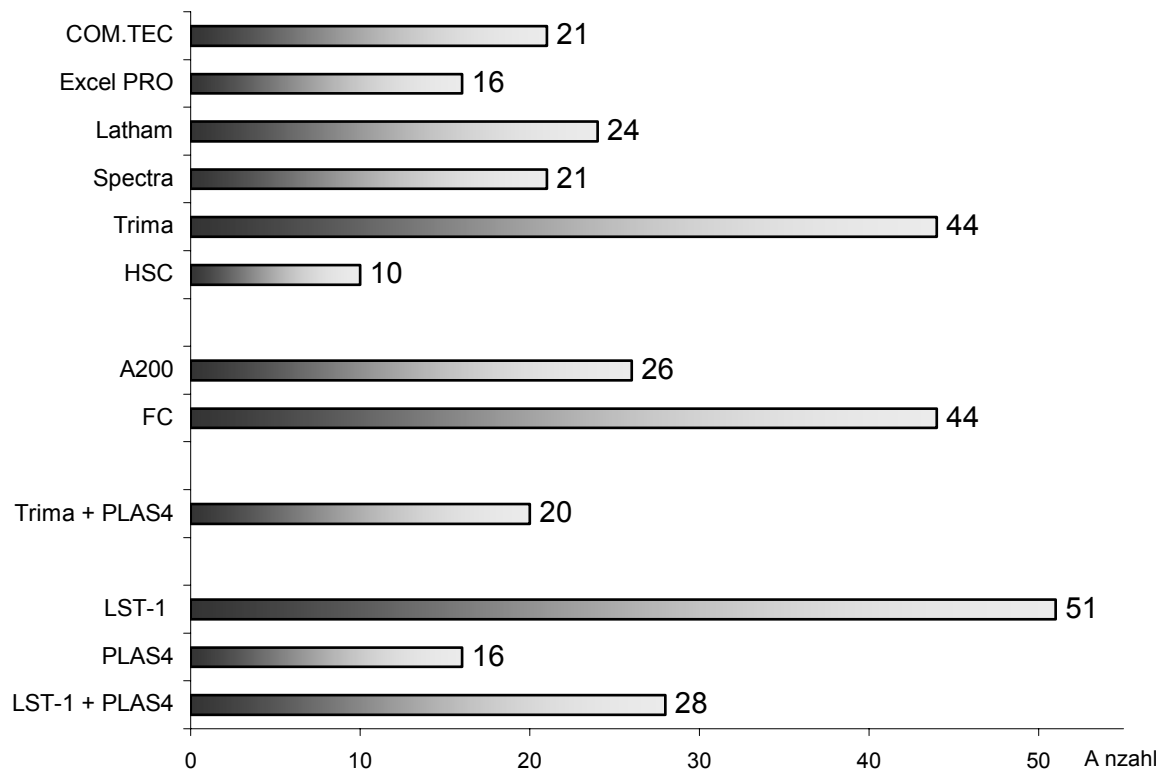


Abbildung 11: Anzahl der Einzelproben der verschiedenen Herstellungsverfahren

Sämtliche Vollblutspenden sowie die Plasmaproben von der COM.TEC, Excel PRO, Spectra und Trima stammen aus der Blutspendeabteilung des Institutes für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Jena.

Die Plasmaproben der APC A200 kommen von Apheresespendern des Institutes für Transfusionsmedizin Suhl gGmbH.

Von Apheresespendern des DRK-Blutspendedienst Berlin gGmbH sind die Plasmaproben, die mit der MCS+ in Kombination mit der Lathamglocke hergestellt wurden.

Die Plasmaproben durch Herstellung mit der HSC-Glocke sowie mit der FC-Glocke stammen von Apheresespendern des DRK-Blutspendedienst Sachsen, Institut für Transfusionsmedizin Plauen.

4.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Statistik-Software SPSS 12.0 for WINDOWS angewandt.

Zur Prüfung der Messgrößen auf ihre Normalverteilung innerhalb der Wertegruppen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen. Durch die Ablehnung der Normalverteilung in jeweils mindestens einer der Gruppen wurden daraufhin zur statistischen Datenanalyse nichtparametrische Verfahren eingesetzt.

Zum Nachweis statistischer Signifikanzen bei der Abreicherung von Zellen und Zellantigenen zwischen Spenderplasma vor Bearbeitung (Ausgangsplasmen) und produziertem Plasma einer der Herstellungsverfahren kam der Wilcoxon-Test als ein nichtparametrischer Test zweier verbundener Stichproben zur Anwendung. Es gilt eine exakte 2-seitige Signifikanz bei $p < 0,050$.

Zum Vergleich aller Werte einer bestimmten Gruppe untereinander kam der Kruskal-Wallis-Test als ein nichtparametrischer Test k-unabhängiger Stichproben zum Einsatz. Als Gruppe wurden zum einen alle Herstellungsmethoden zusammen, als auch die Gruppe der allein zentrifugierenden Methoden (COM.TEC, Excel PRO, Latham, Spectra, Trima, HSC), die Gruppe der Aphereseplasmen mit Membranfilterung (A200 und FC) und die Gruppe der verschiedenen Methoden der Filterung von Plasmen aus der VB-Herstellung (LST-1, PLAS4 und LST-1+PLAS4) herangezogen. Von einer asymptotischen Signifikanz kann bei einem p -Wert $< 0,050$ ausgegangen werden.

5 Ergebnisse

5.1 Immunoassay

5.1.1 Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsverfahren

Der Nachweis von antigenem Restmaterial in den Plasmaproben erfolgte durch die Messung der Extinktionen nach Ansatz eines Immunoassays. Einen Überblick der Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsmethoden zeigt Abb.12. Als positiv galten Extinktionswerte $>0,200$.

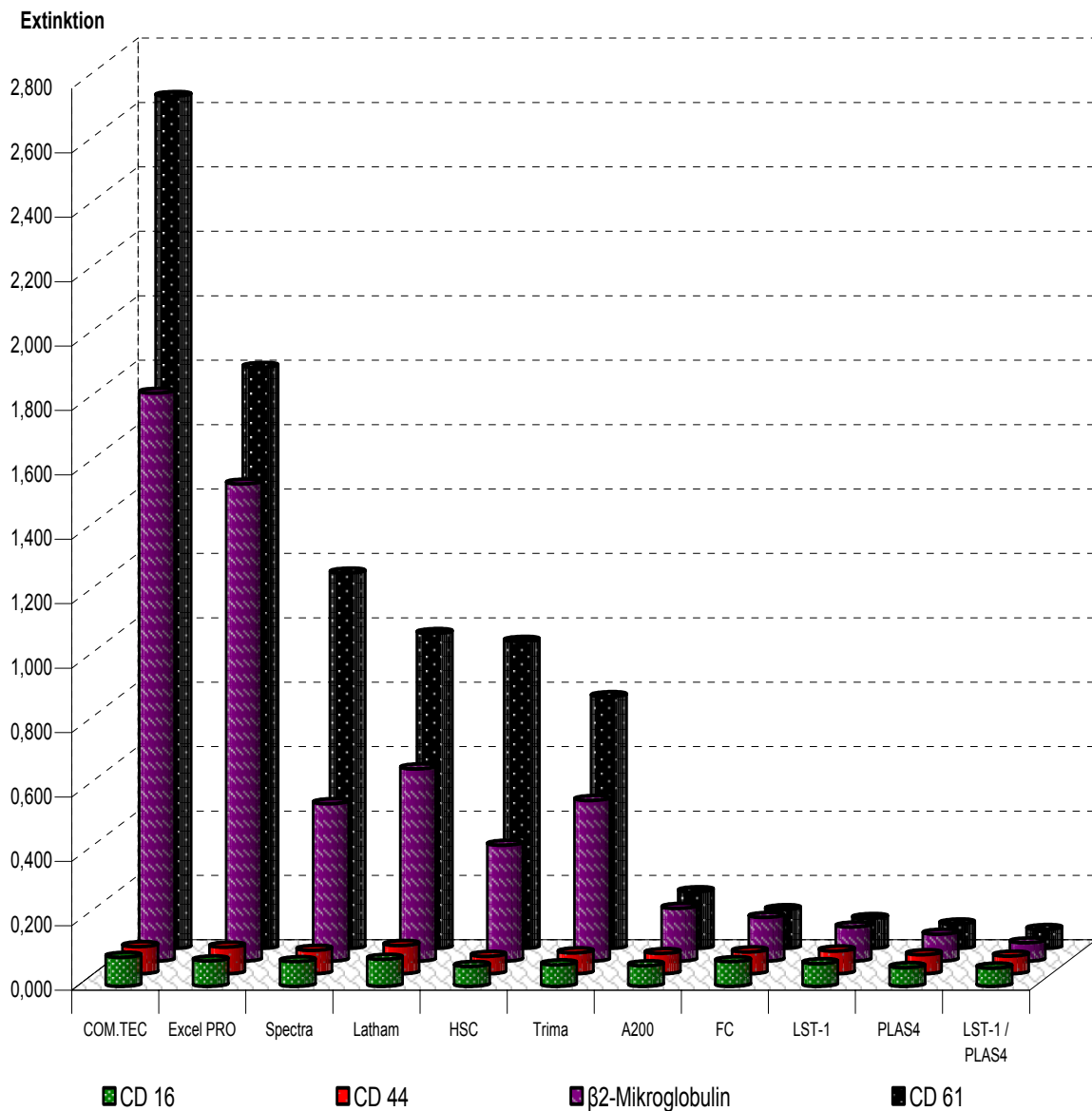


Abbildung 12: Übersicht der Extinktionsmittelwerte mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern bei den verschiedenen Herstellungsverfahren
Antigene Reste von HLA-Kl. I (β_2 -Mikroglobulin) und HPA (CD61) konnten in deutlich unterschiedlichen Größen und Mengen nachgewiesen werden. Erythrozytäre- (CD44) und granulozytäre Antigene (CD16) wurden hingegen in keinem der untersuchten Plasmen aufgefunden.

Die höchsten positiven Extinktionswerte durch HLA-Kl. I zeigten im **Mittelwert** (*Stabw*) folgende Herstellungsverfahren in absteigender Reihenfolge:

COM.TEC	1,764 (0,859)
Excel PRO	1,482 (0,970)
Latham	0,597 (0,173)
Trima	0,499 (0,354)
Spectra	0,489 (0,295)
HSC	0,360 (0,096)

A200 mit **0,164** (0,099), **FC** mit **0,136** (0,046), **LST-1** mit **0,106** (0,061), **PLAS4** mit **0,083** (0,017) und **LST-1 / PLAS4** mit **0,057** (0,006) brachten im Mittel nur negative Extinktionswerte hervor.

Beim statistischen Vergleich aller Verfahren mit dem Kruskal-Wallis-Test war der Unterschied der Ergebnisse hoch signifikant ($p < 0,001$). Vergleich man nur die Ergebnisse der Herstellungsmethoden durch Zentrifugation und der Filtermethoden aus der VB-Herstellung für sich allein, zeigten auch diese untereinander einen hohen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Die beiden Aphereseverfahren mit Verwendung einer Membran unterschieden sich nicht signifikant untereinander ($p = 0,798$).

Die mittleren Extinktionswerte durch HPA waren bei den gleichen Herstellungsverfahren positiv, nur in einer etwas anderen Reihenfolge:

COM.TEC	2,647 (0,545)
Excel PRO	1,805 (0,997)
Spectra	1,166 (0,645)
Latham	0,978 (0,371)
HSC	0,954 (0,387)
Trima	0,782 (0,638)

Auch hier fielen die Resultate der **A200** mit **0,177** (0,106), **FC** mit **0,121** (0,067), **LST-1** mit **0,094** (0,033), **PLAS4** mit **0,077** (0,016) und **LST-1 / PLAS4** mit **0,059** (0,006) im Mittel negativ aus. Der Kruskal-Wallis-Test ergab eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$) beim Vergleich aller Herstellungsmethoden miteinander. Die Methoden der alleinigen Zentrifugation ($p < 0,001$), Aphereseplasmen mit Einsatz einer Membran ($p = 0,022$) und Plasmen aus der VB-Herstellung mit anschließender Filterung ($p < 0,001$) für sich alleine unterschieden sich ebenfalls signifikant.

Die Messwerte von HLA-KI. I und HPA differierten oft innerhalb eines Herstellungsverfahrens mit großen Unterschieden zwischen den einzelnen Plasmen, was z.T. auch zu großen Ergebnisspannweiten führte. Die Abb.13 (HLA-KI. I/ β_2 -Mikroglobulin) und Abb.14 (HPA/CD61) stellen diese Spannweiten mit jeweiligem Minimum und Maximum graphisch dar.

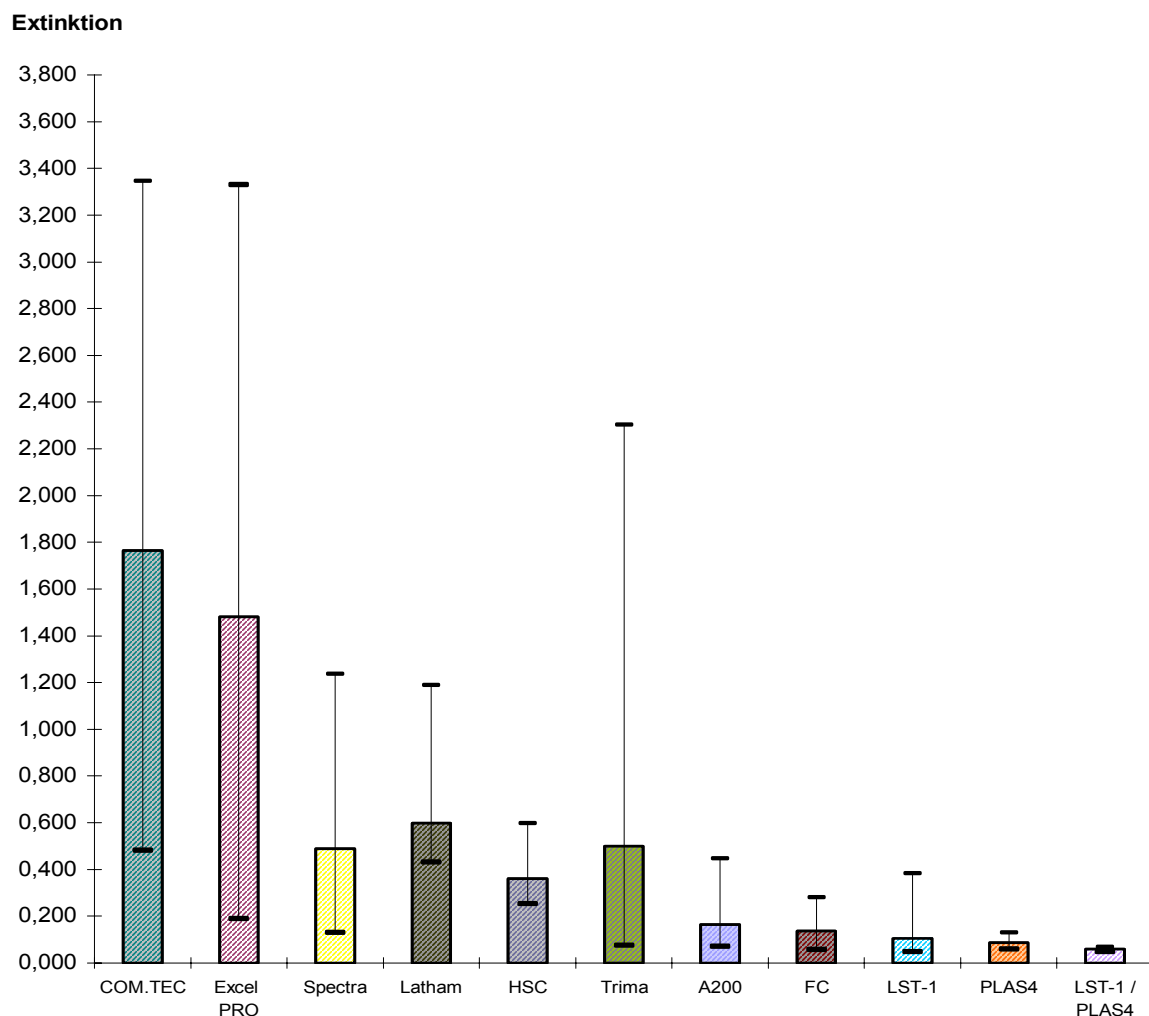


Abbildung 13: Darstellung der Mittelwerte und Ergebnisspannweiten von HLA-KI. I

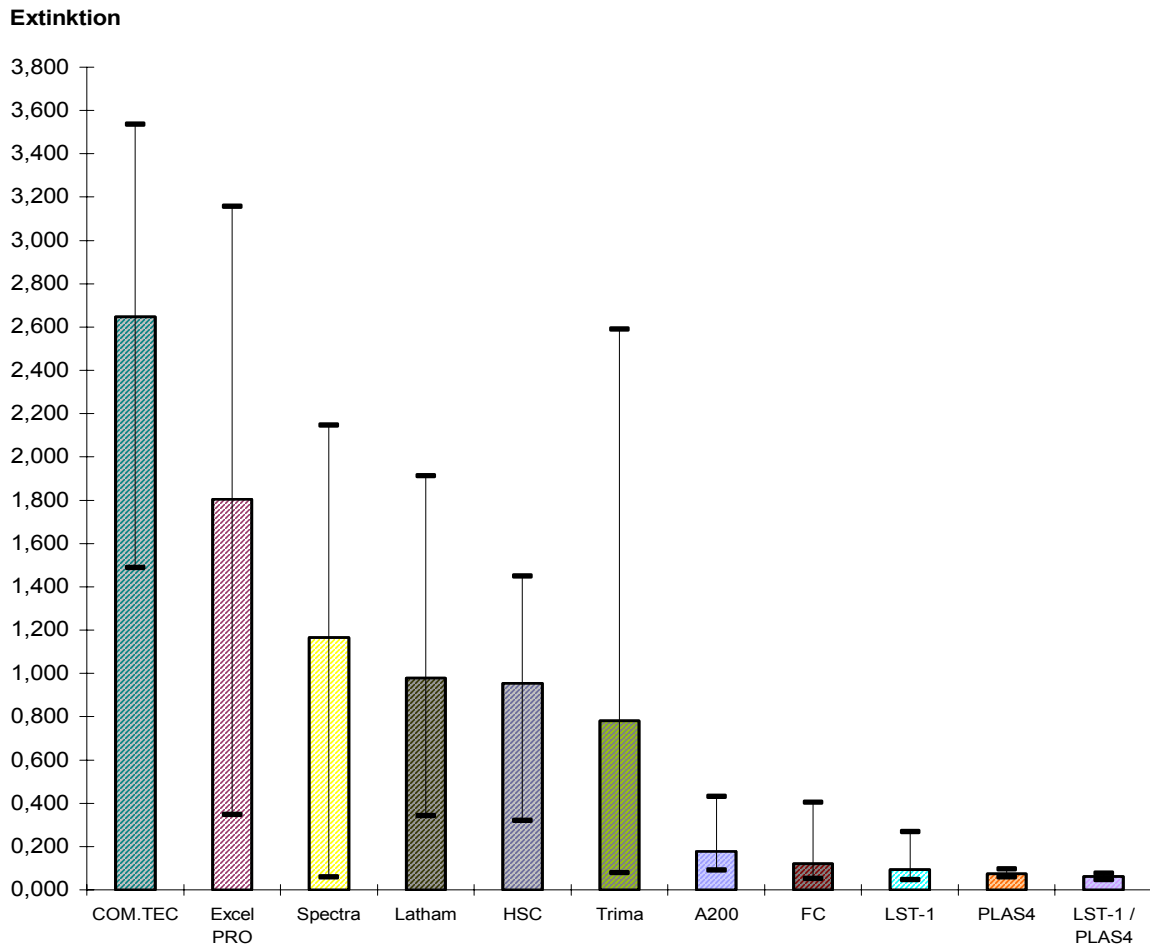


Abbildung 14: Darstellung der Mittelwerte und Ergebnisspannweiten von HPA

Die positiv gemessenen Ergebnisse wurden für die nachfolgende Auswertung je nach Höhe der Extinktion in eine der vier Untergruppen eingeteilt (Tab.3).

Tabelle 3 : Einteilung der Extinktionswerte nach deren Höhe in Untergruppen

Extinktion	Untergruppe
0,201 – 1,000	+
1,001 – 2,000	++
2,001 – 3,000	+++
> 3,000	++++

Neben dem mittleren Extinktionswert eines Herstellungsverfahrens ist auch der prozentuelle Anteil an positiven Plasmen innerhalb des jeweiligen Verfahrens für dessen qualitative Bewertung aussagekräftig.

Alle Plasmen der **COM.TEC**, **Latham** und **HSC** ergaben positive Werte bei der Messung von HLA-Kl. I, bei der **Excel PRO** immerhin noch zu 94%, **Spectra** zu 86% und **Trima** zu 91%. Hingegen waren die Plasmen bei **A200** (15%), **FC** (9%) und **LST-1** (6%) deutlich seltener positiv. Nach Filtration mit dem **PLAS4** bzw. **LST-1/PLAS4** konnte in keinem Plasma mehr HLA-Kl. I nachgewiesen werden (Tab.4).

Tabelle 4: Darstellung des Anteils an HLA-Kl. I- positiven Plasmen in Prozent und Anzahl der Einzelplasmen in den jeweiligen Untergruppen

	COM. TEC	Excel PRO	Spectra	Latham	HSC	Trima	A200	FC	LST-1	PLAS 4	LST-1 / PLAS4
positiv in %	100	94	86	100	100	91	15	9	6	0	0
Zahl (n)	21	16	21	24	10	44	26	44	51	36	28
-	0	1	3	0	0	4	22	40	48	36	28
+	5	6	16	23	10	38	4	4	3		
++	7	3	2	1		1					
+++	7	5				1					
++++	2	1									

Die Plasmen aus der Herstellung mit **COM.TEC**, **Excel PRO**, **Latham** und **HSC** traten alle HPA-positiv auf. Bei der **Spectra** (90%) und **Trima** (91%) brachten ebenso die meisten Plasmen positive Messwerte hervor, währenddessen dies bei **A200** (19%), **FC** (9%) und **LST-1** (2%) nur wenige Einzelplasmen taten. Nach Filtration mit dem PLAS4 oder kombinierter LST-1/PLAS4-Filtration waren alle Plasmen ohne Nachweis von HPA (Tab.5).

Tabelle 5: Darstellung des Anteils an HPA- positiven Plasmen in Prozent und Anzahl der Einzelplasmen in den jeweiligen Untergruppen

	COM. TEC	Excel PRO	Spectra	Latham	HSC	Trima	A200	FC	LST-1	PLAS 4	LST-1 / PLAS4
positiv in %	100	100	90	100	100	91	19	9	2	0	0
Zahl (n)	21	16	21	24	10	44	26	44	51	36	21
-	0	0	2	0	0	4	21	40	50	36	21
+		5	5	13	4	28	5	4	1		
++	2	3	13	11	6	9					
+++	14	6	1			3					
++++	5	2									

5.1.2 Abreicherung der Zellantigene

Zur Darstellung der Abreicherung der verschiedenen Zellantigene durch die Prozedur der einzelnen Herstellungsverfahren wurden die oben dargestellten Extinktionen der produzierten Plasmen im Einzelnen mit dem jeweiligen Ausgangsextinktionswert des entsprechenden Spenders nach Zentrifugation dessen VB verglichen. Die so erhaltenen Ausgangsplasmen wurden dabei demselben Messverfahren unterzogen. Die mittleren Extinktionswerte der Ausgangsplasmen unterschieden sich nicht wesentlich zwischen den verschiedenen Herstellungsverfahren (Abb.15/16). Eine Ausnahme bildeten hier die Werte aus der Herstellung mit der Lathamglocke.

Es konnte bei allen Herstellungsverfahren nach Anwendung des Wilcoxon-Tests eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$) bei der Abreicherung von positiven HLA-Kl. I vom Ausgangsplasma zum produzierten Plasma nachgewiesen werden.

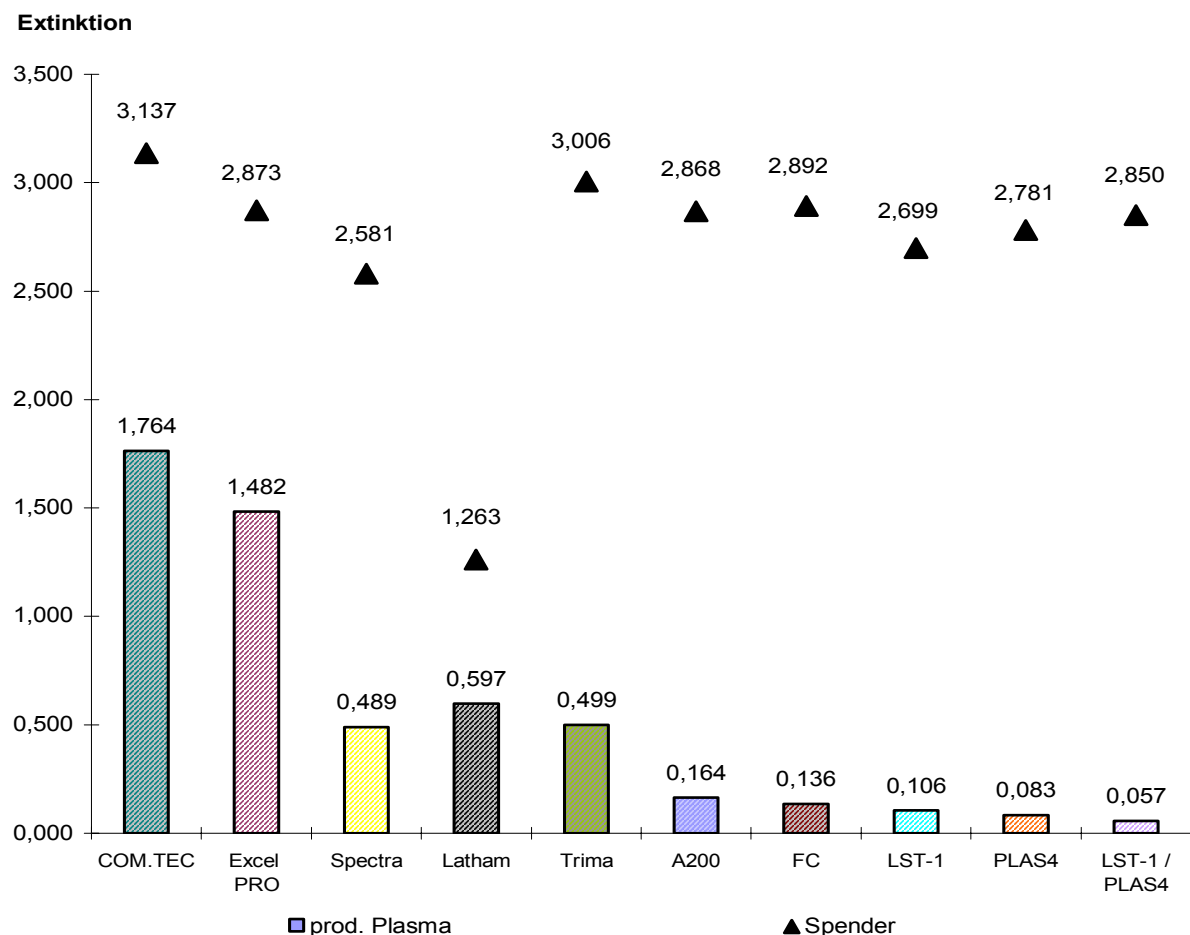


Abbildung 15: Vergleich der mittleren Extinktionen von HLA-Kl. I im Plasma des Spenders und im produzierten Plasma

Auch die eigentlichen Differenzwerte der Abreicherung im Vergleich aller Herstellungsmethoden waren hoch signifikant ($p < 0,001$). Betrachtete man ausschließlich die zentrifugierenden Verfahren erhielt man ebenso eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$). Die beiden Methoden mit Membran ($p = 0,908$) und die gefilterten VB-Plasmen ($p = 0,348$) differierten in ihrer Gruppe nicht signifikant.

Die Abreicherung von CD61-positiv-antigenem Material war bei allen Herstellungsverfahren nach Anwendung des Wilcoxon-Tests hoch signifikant. Alle Verfahren zeigten mit Ausnahme der COM.TEC ($p = 0,001$) einen p -Wert $< 0,001$.

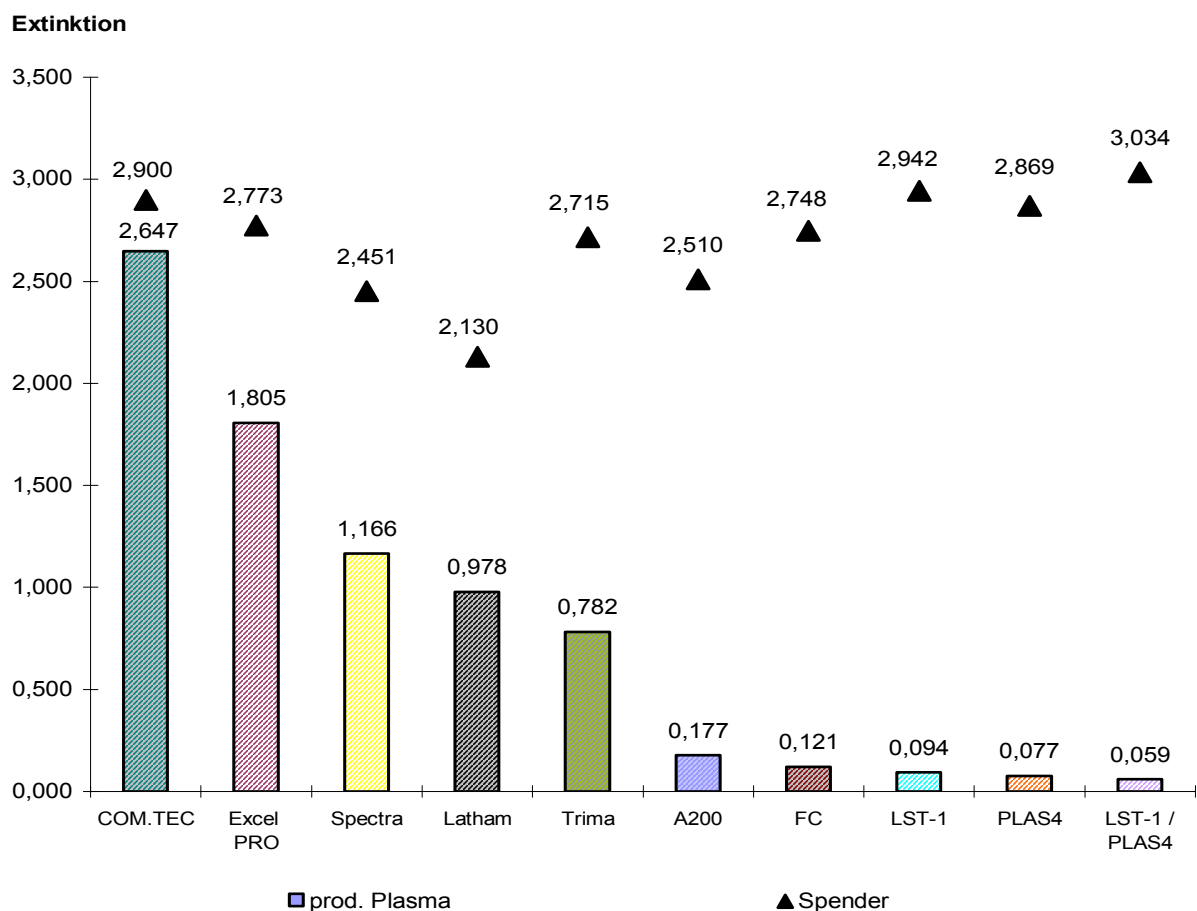


Abbildung 16: Vergleich der mittleren Extinktionen von HPA im Plasma des Spenders und im produzierten Plasma

Beim Vergleich der Differenzwerte durch die Abreicherung variierten alle Herstellungsverfahren bei Anwendung des Kruskal-Wallis-Test hoch signifikant ($p < 0,001$). Auch die zentrifugierenden Verfahren allein ($p < 0,001$) und die Apheresetechniken mit Membran ($p = 0,009$) unterschieden sich signifikant, im Gegensatz zu den verschiedenen Filterverfahren ($p = 0,318$).

Die Ergebnisse der Zellantigenabreicherung in Prozent zeigt Tab.6. Während bei den zentrifugierenden Herstellungsverfahren die Abreicherung der Zellantigene unter 85% ausfiel, waren die Resultate bei den filtrierenden Verfahren deutlich über 90% anzufinden.

Tabelle 6: Abreicherung der Zellantigene in Prozent beim Immunoassay

	HLA Klasse I	HPA
COM.TEC	43,8 %	8,7 %
Excel PRO	48,4 %	34,9 %
Spectra	81,0 %	52,4 %
Latham	52,7 %	54,1 %
Trima	83,9 %	70,4 %
A200	94,3 %	93,0 %
FC	95,3 %	95,6 %
LST-1	96,1 %	96,8 %
PLAS4	97,0 %	97,4 %
LST-1 / PLAS4	97,9 %	98,0 %

5.2 Cell-Dyn 4000

5.2.1 Ergebnisse der verschiedenen Herstellungsverfahren

Alle Plasmaproben wurden nach ihrer jeweiligen Gewinnung vor dem Einfrieren mit dem Blutbildautomaten Cell-Dyn 4000 gemessen. Sämtliche Durchschnittswerte bei Messung der RBC betrugen $0,000 \times 10^{12}/l$, daher konnten hier folglich auch keine Aussagen über Abreicherungen und statistische Signifikanzen getroffen werden.

Eine Darstellung der Anzahl an WBC im hergestellten Plasma zeigt Abb.17 und belief sich im **Durchschnitt** auf (*Stabw*):

COM.TEC	$0,004 \times 10^9/l$ (0,003)	A200	$0,001 \times 10^9/l$ (0,001)
Excel PRO	$0,004 \times 10^9/l$ (0,002)	LST-1	$0,001 \times 10^9/l$ (0,001)
Latham	$0,004 \times 10^9/l$ (0,002)	PLAS4	$0,001 \times 10^9/l$ (0,001)
Trima	$0,004 \times 10^9/l$ (0,002)	FC	$0,000 \times 10^9/l$ (0,001)
HSC	$0,004 \times 10^9/l$ (0,001)	LST-1/PLAS4	$0,000 \times 10^9/l$ (0,001)
Spectra	$0,003 \times 10^9/l$ (0,002)		

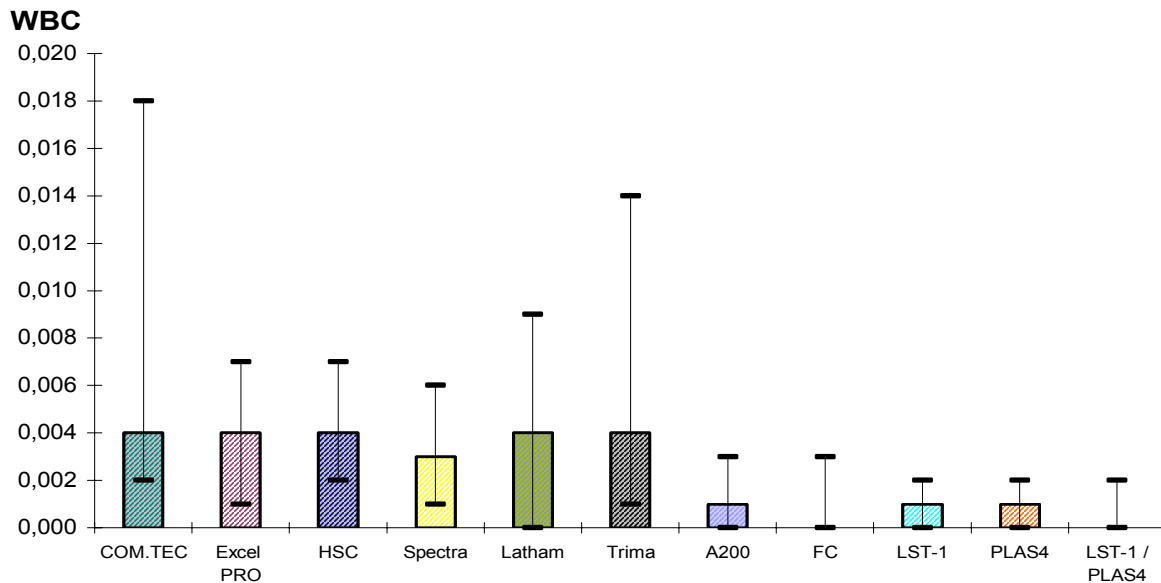


Abbildung 17: Darstellung der mittleren WBC-Zahlen (x10⁹/l) und der Ergebnisspannweiten bei der Messung am Cell-Dyn 4000

Vergleich man alle Herstellungsverfahren miteinander unterschieden sich die WBC-Gehalte hoch signifikant voneinander ($p < 0,001$). Auch die beiden Aphereseplasmen mit Membran ($p = 0,003$) differierten signifikant, während die Methoden der Zentrifugation für sich ($p = 0,994$) und die Filterplasmen für sich ($p = 0,074$) dies nicht taten.

Die WBC-Werte im Spenderausgangsplasma beliefen sich durchschnittlich bei allen Herstellungsverfahren mit Ausnahme der A200 (0,002 x10⁹/l) im Bereich 0,004-0,006 x10⁹/l. Eine graphische Darstellung der WBC-Werte zeigt Abb.18.

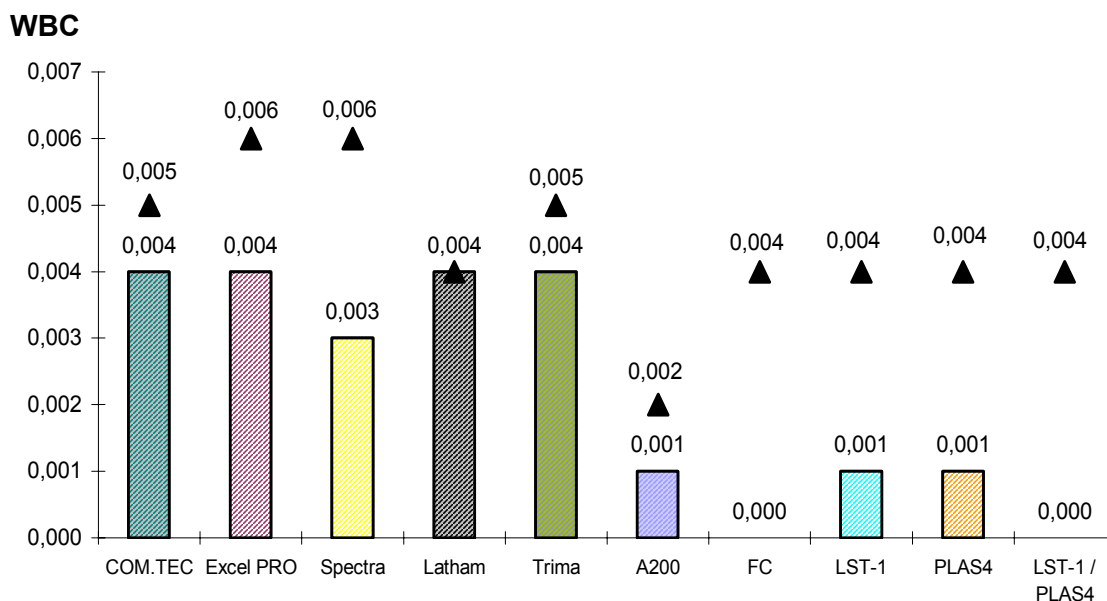


Abbildung 18: Darstellung der Abreicherung der WBC (x10⁹/l) am Cell-Dyn 4000

Die Abreicherung der WBC durch das jeweilige Herstellungsverfahren fiel mit Ausnahme der Latham ($p=0,369$) hoch signifikant aus. Der Grund hierfür liegt an den niedrigen Ausgangswerten der Spender bei den Plasmen der Latham. Alle anderen Verfahren zeigten bei dem Wilcoxon-Test mit Ausnahme der Excel PRO ($p=0,014$) und A200 ($p=0,010$) eine hohe Signifikanz von $p<0,001$.

Die Differenzwerte der Abreicherung unterschieden sich im Betracht aller Verfahren hoch signifikant voneinander ($p<0,001$), wie auch die Apheresen mit Membran ($p=0,000$). Die Gruppe der allein zentrifugierenden Verfahren ($p=0,092$), als auch die Filterplasmen ($p=0,507$) variierten innerhalb ihrer Gruppe nicht signifikant.

Die hergestellten Plasmen präsentierten deutliche Unterschiede bei den durchschnittlich gemessenen PLT-Zahlen (*Stabw*), graphisch dargestellt in Abb.19.

COM.TEC	62,8 x10⁹/l	(17,4)	A200	0,3 x10⁹/l	(0,6)
Excel PRO	30,2 x10⁹/l	(12,0)	FC	0,2 x10⁹/l	(0,3)
HSC	11,2 x10⁹/l	(3,0)	LST-1	0,2 x10⁹/l	(0,1)
Spectra	11,1 x10⁹/l	(6,7)	PLAS4	0,1 x10⁹/l	(0,1)
Trima	7,1 x10⁹/l	(4,9)	LST-1/PLAS4	0,0 x10⁹/l	(0,0)
Latham	6,5 x10⁹/l	(3,2)			

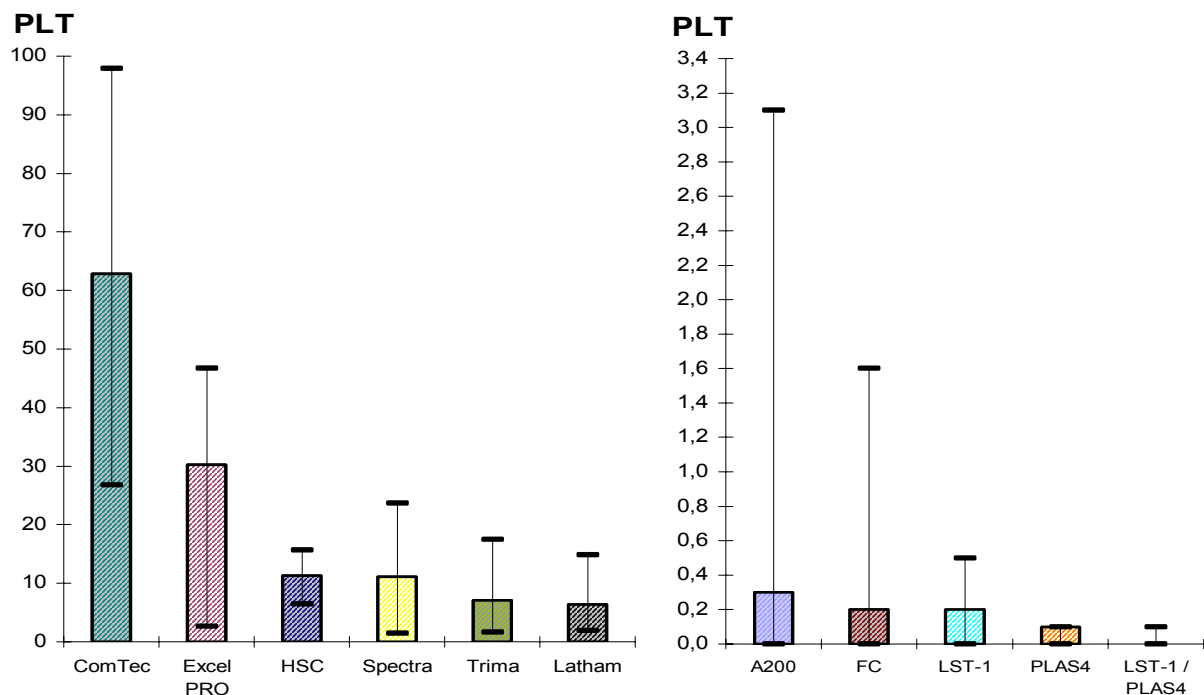


Abbildung 19: Darstellung der mittleren PLT-Zahlen (x10⁹/l) und der Ergebnisspannweiten bei der Messung am Cell-Dyn 4000

Die PLT-Mittelwerte der Spenderausgangsplasmen stellten sich mit Ausnahme bei der **Latham** mit **67,6 x10⁹/l** (Stabw 45,0) größer als 300 x10⁹/l dar. Die Werte der **COM.TEC** mit **403,9 x10⁹/l** (120,6), **Excel PRO** mit **325,0 x10⁹/l** (76,1), **Spectra** mit **333,3 x10⁹/l** (84,9), **Trima** mit **342,0 x10⁹/l** (70,1), **A200** mit **321,7 x10⁹/l** (85,2), **FC** mit **389,4 x10⁹/l** (161,6) **LST-1** mit **323,4 x10⁹/l** (79,3) **PLAS4** mit **358,4 x10⁹/l** (78,1) und **LST-1/PLAS4** mit **348,5 x10⁹/l** (73,6) waren ähnlich (Abb.20).

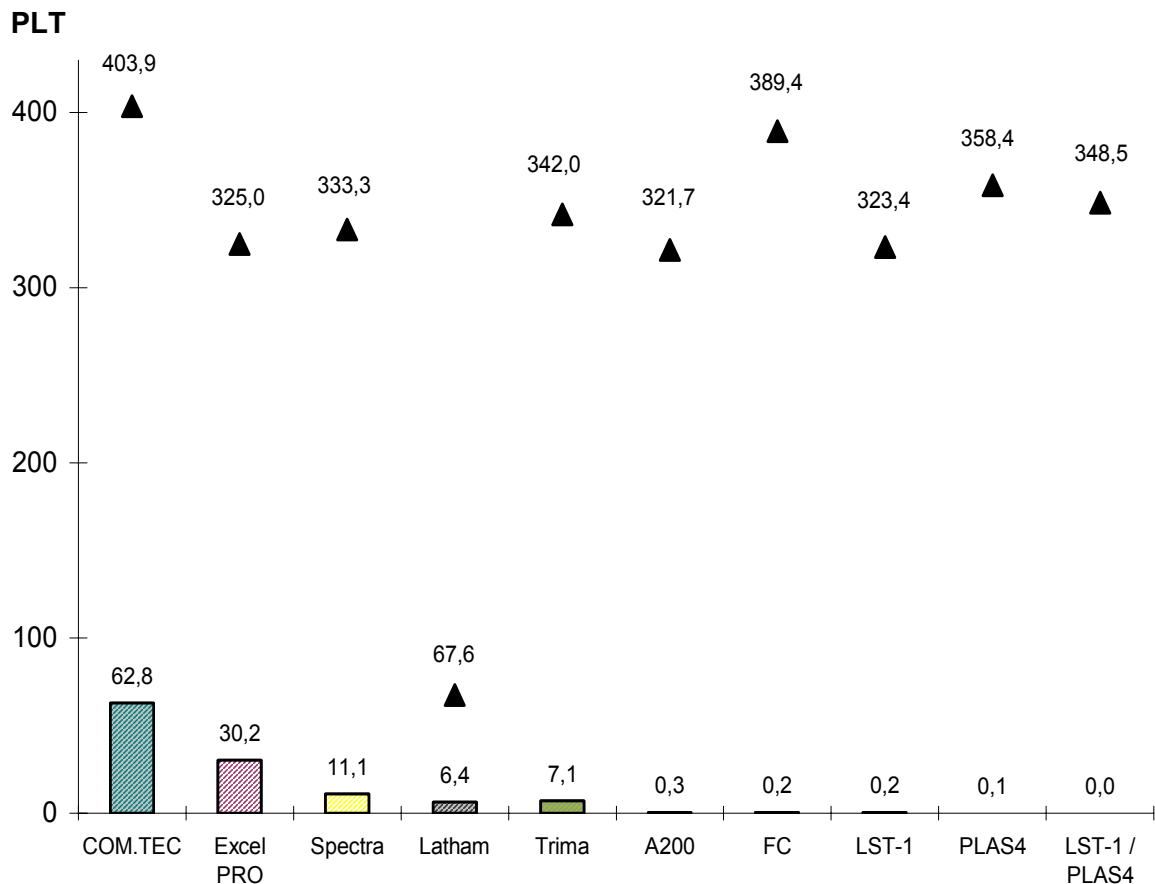


Abbildung 20: Darstellung der Abreicherung der PLT (x10⁹/l) am Cell-Dyn 4000

Die Abreicherung der PLT erschien bei allen Herstellungsverfahren bei Anwendung des Wilcoxon-Test hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Differenzwerte der Abreicherung unterschieden sich im Betracht aller Verfahren hoch signifikant voneinander ($p < 0,001$), wie auch die Gruppe der allein zentrifugierenden Methoden ($p = 0,000$). Die Apheresen mit Membran ($p = 0,073$) als auch die Gruppe der Filterplasmen ($p = 0,091$) zeigten innerhalb ihrer Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Die Abreicherung der Zellen in Prozent zeigt Tab.7.

Tabelle 7 : Abreicherung der Zellen in Prozent beim Cell-Dyn 4000

	WBC	PLT
COM.TEC	20,0 %	84,5 %
Excel PRO	33,3 %	90,7 %
Spectra	50,0 %	96,7 %
Latham	0,0 %	90,5 %
Trima	20,0 %	97,8 %
A200	50,0 %	99,9 %
FC	100,0 %	99,9 %
LST-1	75,0 %	99,9 %
PLAS4	75,0 %	100,0 %
LST-1/PLAS4	100,0 %	100,0 %

5.3 Einsatz des PLAS4 bei Apherese- und Vollblutplasma

Mit dem PLAS4 wurden Plasmen aus zwei unterschiedlichen Produktionsmechanismen gefiltert. 20 Plasmaproben wurden in Form von Aphereseplasma als Beiprodukt mit der Trima gewonnen und anschließend mit dem PLAS4 zusätzlich gefiltert. Hingegen stammten 16 Plasmaproben aus zentrifugierten Vollblutentnahmen mit anschließender PLAS4-Filtration. Beide Varianten ergaben bei ihren Mittelwerten ähnliche negative Ergebnisse (Abb.21). Auch konnte bei keinen der Proben positive Extinktionen gemessen werden.

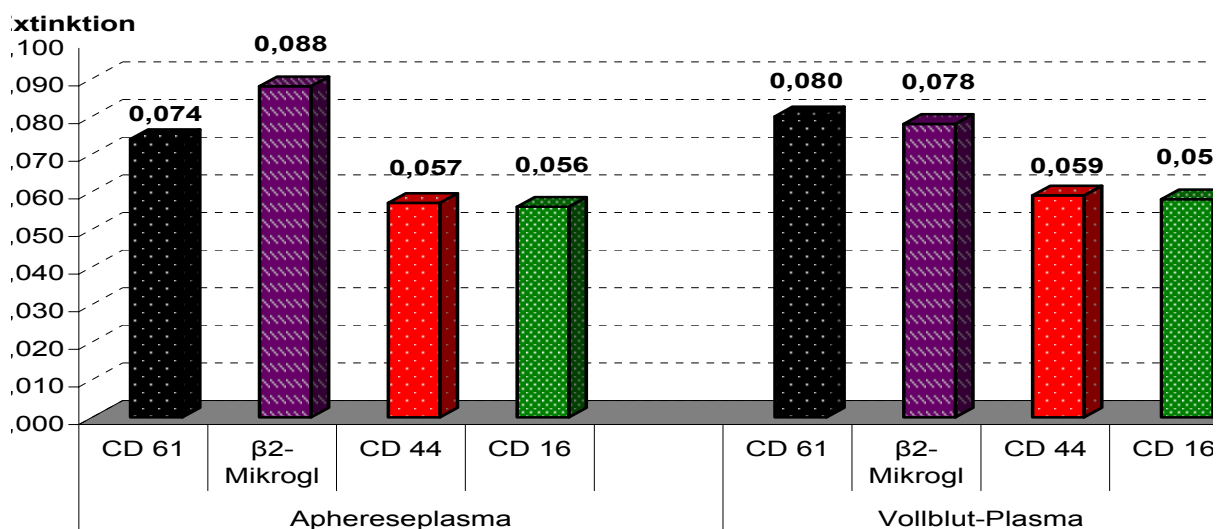


Abbildung 21: Vergleich der durchschnittlichen Extinktionen nach Filtration mit dem PLAS4 von Aphereseplasma der Trima und Vollblutplasma

Zur Darstellung der Abreicherung von Zellantigenen wurden wie oben die Ausgangs-Extinktionswerte der Spender gemessen. Als Zwischenwert konnten die Werte des Aphereseplasma der Trima bzw. des nicht-inlinefiltrierten Plasma vom Vollblut vor Filtration mit dem PLAS4 in identischer Weise bestimmt werden. Diese wurden nun wiederum mit den mittleren Extinktionen des Endproduktes nach jeweiliger Filtration mit dem PLAS4 verglichen.

Es zeigte sich eine Abreicherung von HLA-Kl. I von 2,887 (0,637) beim Spender auf 0,565 (0,446) im Aphereseplasma und wiederum auf 0,088 (0,018) nach Filtration mit dem PLAS4. Ähnlich fand es sich bei der Abreicherung von 2,647 (0,655) vom Spender auf 1,239 (0,586) des Zwischenproduktes vom VB und wiederum auf 0,078 (0,014) nach Filtration.

Die Abreicherung von HPA (CD61) von 2,799 (0,573) beim Spender auf 1,035 (0,724) im Aphereseplasma und wiederum auf 0,074 (0,015) nach Filtration sowie von 2,957 (0,484) beim Spender auf 1,574 (0,839) im Zwischenprodukt aus VB und wiederum auf 0,080 (0,018) nach Filtration sind in Abb.22 dargestellt.

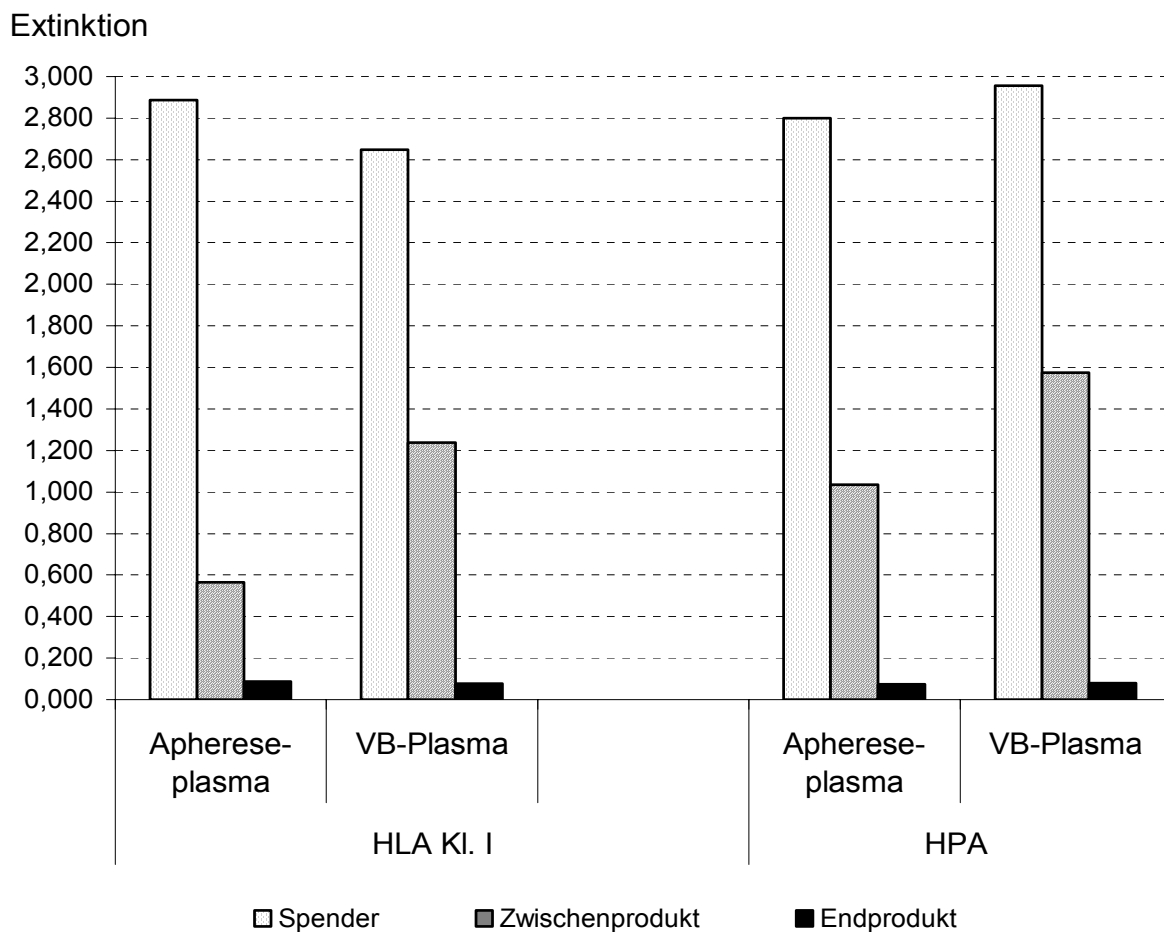


Abb.22: Darstellung der Abreicherung mit PLAS4 filtrierter Plasmen

Sowohl die Abreicherung von HLA-Kl. I als auch HPA waren bei beiden Varianten mit dem Wilcoxon-Test hoch signifikant ($p < 0,001$).

Eine Abreicherung der WBC von 0,004 (0,001) beim Spender auf 0,003 (0,001) im Aphereseplasma und wiederum auf 0,001 (0,001) nach Filtration glich der Abreicherung der WBC von 0,004 (0,002) beim Spender auf 0,003 (0,002) im VB-Zwischenprodukt und wiederum auf 0,001 (0,001) nach Filtration bei der Messung am Cell-Dyn 4000. Die Abreicherung der PLT mit 366,7 (75,1) beim Spender fiel auf 9,5 (5,1) im Aphereseplasma und wiederum auf 0,1 (0,1) nach Filtration. Ähnlich verlief es sich mit 348,5 (83,1) beim Spender auf 5,5 (5,1) im VB-Zwischenprodukt und wiederum auf 0,1 (0,0) nach Filtration.

Beim Vergleich der Extinktionen von Aphereseplasma der Trima und Aphereseplasma der Trima mit zusätzlicher Filterung durch den PLAS4 ergaben sich nach Auswertung mit dem Wilcoxon-Test deutlich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Dies traf sowohl für die Extinktionen von HLA-Kl. I und HPA, als auch für die WBC- und PLT-Werte zu.

Die Abreicherung der Extinktionsmesswerte von HLA-Kl. I und HPA, WBC und PLT vom nicht-inlinefiltrierten Plasma des VB durch anschließende Filtration mit dem PLAS4 erbrachte hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Auch die Abreicherung von WBC zeigten bei dem VB-Plasma ($p = 0,016$) und Aphereseplasma ($p = 0,032$), sowie der PLT (beide $p < 0,001$) signifikante Werte.

6 Diskussion

In Deutschland herrscht schon seit geraumer Zeit eine Diskussion über unerwünschte Zellen und Zellbestandteile in BK, sowie die daraus folgenden Nebenwirkungen und Komplikationen nach Transfusion. In diesem Zusammenhang gaben u.a. *Bordin et al. 1994* Zellzahlen bei nicht WBC-depletierten BK, wie z.B. VB, von annähernd 1×10^9 WBC/E bzw. 5×10^8 Lz/E an, was schließlich 2001 zur vorgeschriebenen WBC-Depletion von zellulären Blutprodukten in Deutschland führte. Im Frischplasma fanden sie noch 5×10^5 WBC/E bzw. 1×10^5 Lz/E. FFP und CSP werden hingegen bis heute allgemein als „zellfreie“ Blutprodukte bezeichnet, zumindest sollen sie nur maximal so geringe Mengen an zellulären Elementen enthalten, dass von diesen keine negativen Auswirkungen ausgehen würden. Daher gibt es gegenwärtig in Deutschland auch keine festen Vorgaben für die Herstellung von WBC-depletiertem Plasma. Obwohl zusätzlich durch den Einfrier- und Auftauprozess bei der Herstellung restliche WBC eigentlich zerstört werden sollten, zeigen dennoch heute mehrere Studien geringe, aber trotzdem auffindbare Mengen von zum Teil sogar noch lebensfähigen WBC in Plasmaprodukten [*Vrielink und van der Meer 2004*]. Der kritische cill-Wert von 1×10^6 WBC/E wird häufiger deutlich überschritten. *Willis et al.* fanden 1998 in Plasmapräparaten $0,04-45,4 \times 10^6$ WBC/l, wobei sich die Zahlen im Frischplasma von denen im FFP nicht signifikant unterschieden. Mehr als 85% der Präparate enthielten $>1 \times 10^6$ WBC/l und über 43% sogar $>5 \times 10^6$ WBC/l. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren [*Bernvil et al. 1994, Narvios et al. 2004, Riggert et al. 1997, Wieding et al. 1994 und van der Meer et al. 1999*]. Letztere wiesen zudem $4 \pm 3 \times 10^9$ PLT/E nach. In frischen nichtgefilterten Plasmapools fanden *Rider et al. 1998* $37 \pm 17 \times 10^6$ WBC/l mit 98% vitalen WBC. Selbst nach dem Einfrier- und Auftauprozess waren noch $31 \pm 13 \times 10^6$ WBC/l mit 0,2% vitalen WBC auffindbar. Nach *Vrielink und van der Meer 2004* ist ein Restzellgehalt $<1 \times 10^8$ RBC/E im Plasma ausreichend, um eine primäre D-Immunisierung zu verhindern, was z.B. bei *Rider et al. 1998* mit $1,93 \pm 1,22 \times 10^9$ RBC/l nicht ganz erreicht wurde. Es gibt bis heute nur wenige Daten zu Restzellen nach Plasmafiltration. Die Zahlen liegen hier deutlich niedriger: $<1 \times 10^5$ WBC/E [*Willis et al. 1998*], <53 WBC/E [*Cardigan et al. 1999*] jeweils mit dem LPS1-Filter. *Pasqualetti et al.* bestätigten 2003 eine 3-log Reduktion der WBC nach Filterung sowohl von Plasmapools als auch von Aphereseplasma.

In der Literatur finden sich mittlerweile eine Reihe von Veröffentlichungen, die Gehalt und Auswirkungen von Zellen und Zellbestandteilen in Plasmapräparaten darstellen. Als potentielle Nebenwirkungen von WBC in Plasmen beschrieben *Chabanal et al. 2003* die Alloimmunisation, Transmission von Pathogenen sowie die Freisetzung von potentiell schädlichen bioaktiven Substanzen und proteolytischen Enzymen. In einigen Fällen wird die Transfusion von FFP als mögliche Ursache einer TA-GvHD diskutiert und auch *Narvios et al. glaubten 2004*, dass die Zahl der im Plasma enthaltenen Lz dafür ausreichen könnte, wohingegen *Murphy et al. 1998* keine Notwendigkeit für eine WBC-Depletion zu deren Vermeidung sahen. Bei einem einzelnen Patientenfall, zit. in [*Andersen und Weinstein 1990*] genügten schon 1×10^4 Lz/l im Frischplasma zur Auslösung einer TA-GvHD aus.

Auch *Hiruma und Okuyama* bestimmten 2001 unter Einsatz von Propidiumiodid (PI) und fluoreszierenden AK u.a. die Anzahl und Lebensfähigkeit von WBC im FFP, um potentielle WBC-assoziierte Nebenwirkungen, speziell das Risiko der Alloimmunisierung, von Plasma zu untersuchen. Die meisten der $2,98 \times 10^6$ WBC/E waren PI-positive tote Zellen, aber auch eine geringe Anzahl von konsistenten PI-negativen lebenden Zellen war darin enthalten. Sowohl tote als auch lebende Zellen exprimierten HLA-KI. I, während 38% dieser Zellen noch zusätzlich HLA-KI. II trugen. Nach den Erkenntnissen dieser Autoren können sich WBC in BK zwar nicht vermehren, aber zumindest eine gemischte Zellkultur mit dem Potential zur Auslösung einer Alloimmunisierung beim Patienten bilden. Sie fanden zudem $2,36 \times 10^4$ lebensfähige CD3+T-Lz /E, sowie $0,22 \pm 1,22 \times 10^6$ tote und $0,51 \pm 0,41 \times 10^6$ vitale CD19+B-Lz/E mit einer signifikanten Zellreduktion nach Plasmafilterung. Sie kamen so zu dem Ergebnis, dass trotz geringer Anzahl an T-Lz/E eine signifikante Anzahl lebensfähiger T-Lz bei Patienten mit großem FFP-Verbrauch durch TPE transfundiert werden kann und folglich ein theoretisches Risiko für eine TA-GvHD und anderen WBC-vermittelten Komplikationen existiert.

Claas et al. zeigten 1981 in einem Tiermodell mit Mäusen, dass durch transfundierte PLT alleine keine Bildung von AK beim Empfänger hervorgerufen wurde, aber bei einer zusätzlichen Kontamination mit $\geq 1 \times 10^3$ WBC/E eine Alloimmunisierung erfolgte. Die äquivalente Menge an WBC allein erzeugte hingegen eine schwächere AK-Bildung. *Rozman* beschrieb 2002 wiederum, dass die WBC-Depletion zwar die transfusionsinduzierte HLA-Alloimmunisierung reduziert, wodurch die Produktion von PLT-spezifischen Allo-AK jedoch nicht verringert wird. *Brand et al.* stellten 1988 nach

Transfusion von $<20 \times 10^6$ WBC/E bei 19% der Patienten eine Bildung von HLA-AK fest und sogar 6% bekamen einen klinischen Refraktärzustand gegenüber PLT. Auch *Narvios et al.* glaubten 2004 trotz geringer Anzahl von PLT im Plasma an deren wichtige Rolle bei dessen Entwicklung. *Van Marwijk Kooy et al.* zeigten 1991 eine klar höhere Inzidenz einer Alloimmunisierung bei $>50 \times 10^6$ WBC/E mit 59% als mit 11% bei $<50 \times 10^6$ WBC/E. Bei *Saarinen et al.* traten 1990 nach Transfusion von $<1 \times 10^6$ WBC/E keine Refraktärzustände gegen PLT auf, im Gegensatz zu 52% bei Versorgung mit nicht-depletierten Konzentraten. *Ohto et al.* konnten in einer Studie 2000 bei zwei von 12 ausschließlich mit FFP transfundierten Patienten und zuvor negativer Transfusionsanamnese nach 14 Tagen HLA-AK nachweisen. Durch den Ausschluss einer passiven AK-Transfusion gingen sie davon aus, dass auch Plasma zu einer Alloimmunisierung führen kann. Nach *Bordin et al.* 1994 könnte diese nicht nur von der Anzahl der WBC, sondern auch von der Präsenz von MHC oder anderen Antigenen, sowohl in löslicher Form als auch als Mikropartikel, abhängig sein. *Ramos et al.* hielten es 1994 durchaus für möglich, dass auch WBC-Fragmente zu einer Alloimmunisierung führen können. Bei Filterung der BK später als 48h nach Herstellung stieg bei *Dijkstra-Tiekstra et al.* 2004b die Zahl an WBC-Fragmenten mit Dauer der Lagerung bis auf eine derartige Menge wie von intakten WBC an, die selbst eine HLA-Immunsierung auslösen können.

Das CMV ist ein zellabhängiger Virus, dessen erforderliche Anzahl von infizierten WBC für eine Transmission nicht genau bekannt ist. Allogene Effekte, infolge einer Stimulation durch Zytokine, können nach *Ljungman* 2004 eine Virusreaktivierung verursachen. *Bowden et al.* berichteten 1995, dass eine WBC-Depletion das Risiko einer Virustransmission durch Blutprodukte auf das gleiche Level senkt, wie die Auswahl von CMV-negativen Blutprodukten. *Bowden und Sayers* untersuchten 1990 FFP auf ihre CMV-Infektiosität und fanden ebenso wie *Narvios et al.* 2004 jedoch keine positiven Fälle.

Die Übertragung einer klassischen CJD durch die Transfusion von BK kann bis heute nicht bestätigt werden. Es konnten aber mittlerweile zwei Fälle einer Prionenübertragung der nvCJD durch nicht-leukozytendepletierte EKs beschrieben werden [*Llewelyn et al.* 2004, *Peden et al.* 2004]. Möglicherweise ist der entscheidende Unterschied für die Übertragungsmöglichkeit durch Blut bei der nvCJD zu anderen Prionenerkrankungen die Anwesenheit von PrP^{Sc} und Infektiosität in lymphatischem Gewebe [*Ironside und Head* 2004]. Der früh vermutete Zusammenhang von WBC

und nvCJD hat schon mehrere Länder (z.B. UK) dazu veranlasst, die WBC-Depletion auch für FFP einzuführen. Bei der Fraktionierung von Plasma scheint eine Elimination der Prionen stattzufinden, was diese Produkte allem Anschein nach sicher macht. Allerdings besteht hingegen für therapeutisches Plasma schon ein theoretisches Infektionsrisiko. Ob die WBC-Depletion dieses effektiv reduzieren kann schien lange ungewiss [Sivakumaran 2000, Turner 2001]. Es gibt jedoch gewisse tierexperimentelle Hinweise, dass die Ansteckungsfähigkeit vorwiegend zellassoziiert ist, mit nur eventuell geringen Mengen im Plasma. Aber auch die Möglichkeit der Übertragung durch Plasma kann nach *Ironside und Head 2004* nicht ausgeschlossen werden. *Prowse et al.* untersuchten 1999, ob durch den Filterungsprozess von Blutprodukten eine wesentliche Zellfragmentierung stattfindet und so der Benefit der WBC-Depletion durch Freisetzung von infektiösem Material vermindert wird. In ihren Untersuchungen, auch mit dem LST-1, konnten keine Beweise einer WBC-Fragmentation erbracht werden.

Das PEI schrieb zuletzt, dass die WBC-Depletion neben der anamnestischen Spenderauswahl zu einem weiteren Sicherheitsgewinn in Bezug auf die Vermeidung einer nvCJD durch Blutprodukte führt. Neuere Untersuchungen [Gregori et al. 2004] zeigten, dass die WBC-Filtration den zellulär gebundenen Anteil der Ansteckungsfähigkeit reduziert, aber nur 42% der gesamten endogen (nicht artifiziell gespickten) Infektiosität aus dem Blut von Scrapie-infizierten Hamstern entfernt. Daher kann die WBC-Reduktion als sinnvolle Maßnahme, aber noch nicht als zuverlässiger Schutz gegen eine nvCJD-Übertragung angesehen werden [PEI 2005]. Zumindest könnte aber eine generelle Zellfreiheit von Plasmen das Risiko für Patienten minimieren, solange bis spezifische diagnostische Nachweistests kommerziell verfügbar sind.

Nielsen et al. untersuchten 1997 in Plasmaprodukten den Gehalt von bioaktiven Substanzen, wie z.B. Histamin, eosinophiles kationisches Protein, eosinophiles Protein X und Myeloperoxidase, denen eine bedeutende Rolle bei transfusions-induzierten Nebenwirkungen durch Beeinflussung von Entzündungs- und Immunreaktionen, Immunmodulation, Gewebeschäden und Neurotoxizität zugeschrieben wird. Die Freisetzung erfolgt während der Präparation durch den Einfrierprozess und ihre Konzentrationen waren in filtrierten FFP signifikant niedriger als bei nichtfiltrierten FFP. Um dies während der Lagerung zu vermeiden, ist es effektiver das Plasma schon vor der Lagerung zu filtern und nicht erst in Form einer Bedside-Filtration direkt vor deren Anwendung. Nach *Gutensohn et al. 2000* können z.B. auch

durch das Aphereseverfahren aktivierte PLT mit WBC adhären. Daraus resultiert dann möglicherweise eine Aktivierung der WBC mit Freisetzung von pro-entzündlichen Zytokinen (z.B. IL-1) und folgender lokaler sowie systemischer Entzündungsreaktionen [Hagberg et al. 2000].

Heddle et al. fanden 1994 eine große Korrelation zwischen dem Auftreten von FNHTRs und der Konzentration von bioaktiven Substanzen (z.B. IL-1 β und IL-6) im Plasma. Nachdem sie 64 TKs in ihre Bestandteile Zellen und Plasma aufgetrennt und dann jeweils getrennt transfundiert hatten, fanden auf die Zellen nur sechs und auf das supernatante Plasma jedoch 20 Reaktionen statt. Die Apoptose der WBC und die Aktivierung der Monozyten während der Lagerung spielten dabei eine Rolle [Heddle 1999]. Yazer et al. untersuchten 2004 den Einfluss der universellen prestorage WBC-Reduktion auf das Auftreten von FNHTRs und konnten hierbei eine signifikante Verringerung von 0,33% auf 0,11% bei EKs und 0,45% auf 0,19% bei TKs feststellen. Paglino et al. 2004 und King et al. 2004 bestätigten diese Ergebnisse. Allergische Reaktionen wurden hingegen durch die WBC-Reduktion nicht signifikant gesenkt (0,49% \rightarrow 0,35%).

Interaktionen zwischen WBC und HLA- bzw. granulozytären AK spielen bei der Pathogenese einer TRALI eine Hauptrolle [Dooren et al. 1998, Popovsky 2000, Kopko et al. 2003]. Obwohl zelluläre Blutprodukte 17mal häufiger als Plasma mit einer TRALI assoziiert werden [Silliman et al. 2003], sind dennoch gerade Plasmapräparate ein häufiger Auslöser. Nach Engelfriet und Reesink 2001 ist dabei die Quantität und Qualität des Plasmas mitentscheidend. Webert und Blajchman vermuteten 2003 auch gerade deswegen, dass TTP-Patienten mit einem erhöhten Risiko behaftet sind. Askari et al. berichteten 2002 von einem Fall einer TRALI während eines TPE bei TTP. Das Auftreten von AK in der Bevölkerung ist nicht selten. Bei einer Studie des DRK-BSD-Sachsen in Form eines HLA-AK-Screenings aller Plasmaspender- und spenderinnen wurden bei 9,34% HLA-AK nachgewiesen, 3,06% aller Spender und 16,19% aller Spenderinnen waren positiv. Bei Spenderinnen mit stattgefundenen Schwangerschaften sind AK im Plasma häufig enthalten. Insunza et al. fanden 2004 bei 18,1% dieser Apheresespenderinnen HLA-AK. Durch eine entsprechende Spenderauswahl bzw. Testung jener auf AK kann einer TRALI am effektivsten vorgebeugt werden. Interaktionen von HLA-AK des Patienten und WBC in BK wurden zwar seltener beschrieben, sind aber auch ein möglicher Pathomechanismus [Bux et al. 1996, Santamaria et al. 1998, Zupanska et al. 1999]. Hier

könnte die WBC-Depletion eine effektive Prophylaxe sein. Nach *Bux 2005* wird durch den Einsatz von WBC-depletierten BK die Inzidenz der TRALI durch leukozytäre AK verringert werden, möglicherweise auch die nicht immuner TRALI-Reaktionen. *Kleinman et al.* schlugen *2004* sogar die Verwendung von SD-Plasma anstatt FFP zur Prävention einer TRALI vor, basierend auf der Hypothese des Antigen-AK-Mechanismus, indem sich durch den Poolingprozess der Titer von pathogenen AK verringert und so potentiell gegen TRALI schützt.

Der Beweis von Nebenwirkungen durch WBC und anderen Zellen im FFP ist immer noch schwach. Aber es gibt nicht wenige, für die heute die Herstellung von WBC-freiem FFP allein als Vorsichtsmaßnahme in Betracht kommt. Dieses Plasma könnte auch eine ökonomische Alternative zu den teuren Verfahren der Virusinaktivierung wie SD-Plasma oder MB-Plasma darstellen [*Valbonesi et al. 2001*].

In dieser Arbeit zeigten viele der untersuchten Plasmen, dass Immunisierungen aufgrund des Zellgehaltes möglich sind. Die Verfahren unterschieden sich in ihrer Produktqualität bezüglich Gehalt an Zellen und Zellbestandteilen deutlich. Die Einteilung der Herstellungsverfahren entsprechend ihrer Separationsprinzipien in 1. ausschließlich durch Zentrifugation erfolgter Separation, 2. Zentrifugation inklusive Verwendung einer Filtermembran und 3. Filtration durch Inline-Filter spiegelte sich in den Ergebnissen dieser Untersuchungen wieder.

Erstere differierten wiederum in ihrer Qualität klar. Die neueren Verfahren wie HSC und Trima zeigten im Immunoassay bei den mittleren Extinktionswerten von HPA (CD 61) knapp bessere Ergebnisse als Lathamglocke und Spectra. Mit Abstand am schlechtesten unter den untersuchten Verfahren schnitten die Zellseparatoren COM.TEC und Excel Pro ab. Während sich bei den allein zentrifugierenden Verfahren ein Prozentsatz an positiven Plasmen $\geq 90\%$ zeigte, ergab sich bei den anderen Verfahren dieser prozentuelle Anteil unter 20% . Auch beim Vergleich der Ergebnisse von HLA-Kl. I (β_2 -Mikroglobulin) präsentierten sich diese nahezu ähnlich. Hier trat ebenso bei alleiniger Zentrifugation der Prozentsatz an positiven Plasmen mit $\geq 86\%$ deutlich höher als bei den restlichen Verfahren mit $\leq 15\%$ auf.

Als weiteres Ergebnis dieser Arbeit stellte sich heraus, dass durch eine zusätzliche Filtration von Aphereseplasma (hier Trima) mit dem PLAS4 bei den zuvor überwiegend nach der Apherese noch antigenpositiven Plasmen eine erneute starke Antigenabreicherung erzielt werden konnte und das Endprodukt schließlich als zellfrei anzusehen war (Abb.22). Dies stellt wiederum die Frage in den Raum, ob es

nicht sogar sinnvoll sein könnte, Aphereseplasmen prinzipiell einer zusätzlichen Membranfiltration zu unterziehen.

Durch die Messung der Plasmen am Blutbildautomaten Cell-Dyn 4000 konnten die Ergebnisse des Immunoassays im Prinzip bestätigt werden. Bei Zählung der PLT schnitten COM.TEC und Excel Pro auch hier eindeutig am schlechtesten ab. Die PLT-Zahlen von HSC, Spectra, Trima und Latham ähnelten sich sehr, fielen jedoch deutlich niedriger aus. Die filtrierte Plasmen wiederum brachten sogar PLT-Zahlen von etwa einer Zehnerpotenz niedriger hervor (Abb.19).

Der Gehalt an WBC unterschied sich zwischen den Plasmen kaum. Allerdings enthielten die Plasmen mit Filtration generell meist niedrigere Zellzahlen als die allein zentrifugierenden Separationsverfahren (Abb. 17).

Letztendlich können die Ergebnisse von Immunoassay und Cell-Dyn-Messung zwar nicht direkt ineinander umgerechnet werden und von der Höhe der Extinktionswerte beim Immunoassay nicht direkt auf quantitative Zellzahlen geschlossen werden, die Schlussfolgerungen aus den jeweiligen Ergebnissen jedoch sind ähnlich. Die Extinktionswerte lassen zwar womöglich eher Rückschlüsse auf das jeweilige antigene Potential zu, aber auch durch die Messung am Cell-Dyn 4000 kam man beim Vergleich der Herstellungsverfahren trotz bekannter Ungenauigkeiten bei sehr niedrigen Zellzahlen zu nahezu gleichen Ergebnissen. Die gemessenen WBC-Zahlen von $0,000-0,004 \times 10^9/l$ befanden sich im Bereich des cill-Wertes, die RBC-Werte lagen größtenteils unter der Messgrenze von $0,000 \times 10^{12}/l$ und die gemessenen PLT-Zahlen von $0,0-62,8 \times 10^9/l$ ähnelten den Ergebnissen der Extinktionswerte von HPA auffallend.

Allgemein stellte sich in dieser Arbeit deutlich dar, dass die Abreicherung der Zellen und Zellantigene vom Ausgangsgehalt der Spender durch die jeweiligen Herstellungsverfahren in unterschiedlich hohem Maße gelang. Zufriedenstellende Ergebnisse mit einer Abreicherung von $\geq 90\%$ erhielt man erst bei zusätzlicher Verwendung einer Filtermembran oder durch Inline-Filtration. Die allein zentrifugierenden Verfahren erreichten diese Werte weder bei HLA-KI. I noch bei HPA nicht (Tab.6). Die Abreicherung an PLT erlang am Cell-Dyn sehr gute Werte, lediglich die Plasmen der COM.TEC blieben knapp unter der 90%-Grenze (Tab.7).

Nicht nur die verschiedenen Separationstechniken bestimmen die zelluläre Kontamination der Plasmen, sondern auch die verschiedenen Filtertypen haben ihre Spezifikationen.

Ein Tiefenfilter wie der LST-1 ist besonders für die WBC-Depletion bei Ausgangsmedien mit vielen WBC ausgelegt. Die Entfernung erfolgt durch Adhäsion und ist von der Kontaktzeit mit dem Filtermaterial abhängig. Durch die Struktur des Filters ist die Reduzierung des Zellgehaltes auf Null schwieriger. Ein Oberflächenfilter wie der PLAS4 mit konstanter Porenweite von $0,65\mu\text{m}$ kommt hingegen dem Ziel einer 100%igen Entfernung aller Zellen und Zellfragmente wesentlich näher. Desweiteren sahen *Cardigan et al. 2001* nach Filtration mit dem LST-1 einen signifikanten Einfluss auf die Fibrinogenfreisetzung und den Abfall einiger Gerinnungsfaktoren. *Chabanal et al. 2003* hingegen mit dem PLAS4 eine effektive Reduktion der WBC bei nur geringen Effekten auf die Gerinnungsparameter. *Shiba et al. 1997* beschrieben auch eine Gerinnungsaktivierung beim Gebrauch von Filtern mit negativer Oberflächenladung, wovon der PLAS4 durch seine ungeladene Oberfläche nicht betroffen ist.

Es gibt eine Reihe anderer Autoren, die schon früher den quantitativen Zellgehalt von Plasmen der verschiedenen Zellseparatoren und nach Filtration untersucht haben.

MacoPharma gibt für Blutprodukte nach deren Filtration mit dem **LST-1** eine durchschnittliche Restzahl von $0,25 \times 10^6$ WBC/E und von $1,2 \times 10^9$ PLT/E an. Auch *Prowse et al.* haben 1999 $0,30 \times 10^6$ WBC/E und $2,25 \times 10^9$ PLT/l gemessen. *Cardigan et al.* konnten in ihren Untersuchungen 2001 nur Zellzahlen unterhalb ihrer Sensitivitätsgrenze von $0,3 \times 10^6$ WBC/E und 3×10^9 PLT/l zeigen.

Im Plasma nach Filtration mit dem **PLAS4** präsentierten MacoPharma bei Herkunft aus nichtfiltriertem VB durchschnittlich $7,2 \times 10^3$ WBC/E vor und $0,3 \times 10^3$ WBC/E nach Filtration, hingegen wurden aus vorfiltriertem VB sogar nur $2,2 \times 10^3$ WBC/E vor und $<0,2 \times 10^3$ /E nach Filtration gemessen [*Sensebé et al. 2000*]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Chabanal et al. 2003* mit durchschnittlich $26,4 \times 10^6$ /l WBC vor und $1,412 \times 10^3$ /l nach Filtration bei nichtfiltriertem VB, sowie $9,5 \times 10^3$ /l vor und $<0,667 \times 10^3$ /l von filtriertem VB.

Kientz veröffentlichte 2001 im Plasma der **FC** $0,45 \pm 0,36 \times 10^3$ WBC/l. *Burkhardt et al.* wiesen 2001 geringfügig höhere Werte von $2,8 \pm 1,7 \times 10^3$ /l neben $0,70 \pm 0,88 \times 10^9$ PLT/l und $2,6 \pm 3,6 \times 10^5$ RBC/l nach.

Kunas et al. fanden 1998 im Plasma der **A200** $2 \pm 3 \times 10^3$ WBC/l, $39 \pm 19 \times 10^6$ RBC/l und $9 \pm 2 \times 10^6$ PLT/l. *Dieter et al.* kamen 1998 auf fast identische Restzellzahlen. Die

Blutspende Suhl gibt für ihre Plasmaphereseprodukte mit 220ml Packungsgröße einen Zellgehalt von $\sim 0,6 \times 10^6$ WBC/l, $\sim 0,6 \times 10^6$ RBC/l und $\sim 0,5 \times 10^9$ PLT/l an.

Burnouf et al. bestimmten 2003 im Plasma der **HSC** $3,01 \pm 1,8 \times 10^4$ WBC/l, $9 \pm 7,1 \times 10^6$ RBC/l und $3,5 \pm 2,4 \times 10^9$ PLT/l. *Vrielink et al.* kamen 2001 mit $0,01 \pm 0,01 \times 10^6$ WBC/l, $0,03 \pm 0,1 \times 10^6$ RBC/l und $2 \pm 1 \times 10^9$ PLT/l auf ähnliche Werte. *Vrielink und van der Meer* bestätigten 2004 im Prinzip diese Zahlen.

Zingsem et al. erhielten 2001 bei der **Spectra** $0,11 \pm 0,13 \times 10^6$ WBC/E, $0,59 \pm 3,22 \times 10^6$ RBC/E und $3,59 \pm 1,99 \times 10^9$ PLT/E. Auch *Valbonesi et al.* fanden 2001 durchschnittlich $0,11 \times 10^6$ WBC/E und $17,09 \times 10^9$ PLT/l, wobei 98,9% der Produkte unter 1×10^6 WBC/E und 96,8% der Produkte unter dem Limit der European Guidelines von 50×10^9 PLT/l zu erwarten waren.

Im Plasma der **Trima** fanden sie durchschnittlich $0,11 \times 10^6$ WBC/E und 16×10^9 PLT/l. Es konnten bei 99,9% der hergestellten Plasmen Werte unter 1×10^6 WBC/E und bei 98,5% unter 50×10^9 PLT/l erwartet werden.

Bei der **Latham** waren bei *Valbonesi et al.* 2001 im Mittel $2,10 \times 10^6$ WBC/E und 11×10^9 PLT/l auffindbar. Die Untersucher gehen nur bei 9% der produzierten Plasmen von WBC-Werte unter 1×10^6 /E aus, jedoch über 99,9% der Produkte zeigten PLT-Werte unter 50×10^9 /l.

Im Plasma der **Excel Pro** zeigten sie durchschnittlich $0,16 \times 10^6$ WBC/E und $37,5 \times 10^9$ PLT/l. Sie erwarteten in 97,6% WBC $< 1 \times 10^6$ /E und in 73,2% PLT $< 50 \times 10^9$ /l.

Früher enthielten WBC-arme Blutprodukte etwa 500-1500 WBC/ μ l [*Zingsem et al.* 1994]. Diese Konzentrationen konnten mit Blutbildautomaten extrem einfach und schnell gemessen werden. Durch die immer effizienter werdenden Depletionsverfahren wurde der Nachweis der WBC deutlich schwieriger. Die Genauigkeit der Blutbildautomaten nimmt bei Konzentrationen unter 50-100 WBC/ μ l und 3500-4000 PLT/ μ l deutlich ab und sind daher für die Quantifizierung von sehr kleinen Zellzahlen, wie sie im hergestellten Frischplasma erwartet werden, nicht ausreichend exakt [*Dzik et al.* 2000]. Bei Unterschreiten dieser Grenzen kann der Automat oft nicht mehr zwischen den vorliegenden PLT-Aggregaten und WBC unterscheiden, weshalb folglich zu hohe WBC-Konzentrationen gemessen werden [*Kretschmer* 1991]. Hauptgrund für die Ungenauigkeit ist das zu geringe Messvolumen. Um WBC in der Größenordnung von 1×10^6 bzw. 5×10^6 /E nachweisen zu können, benötigt man Methoden der Zellmessung, die 4 bzw. 20 restliche WBC/ μ l im Plasma effektiv

auffinden können. Die Nachweisgrenze ist vor allem vom Messvolumen abhängig [Dzik 1999]. Je geringer die Anzahl der zu messenden WBC ist, desto größer muss das Messvolumen sein, um eine glaubhafte Anzahl von Ereignissen zu zählen.

Für Messungen in diesem Bereich gilt die Nageotte-Kammer unter Verwendung eines Lichtmikroskops mit einem Messvolumen von 50 μl als „Gold-Standard“. Die theoretische Sensitivitätsgrenze beträgt 0,1 WBC/ μl , doch das tatsächliche Limit liegt durch den WBC-Verlust während der Präparation gewöhnlich 10-20 -fach höher [Nagahashi et al. 2000]. Nach Bordin et al. 1994 wurde eine akkurate Auffindung von 0,5-1 WBC/ μl erreicht und zeigte nach Masse et al. 1992 bis zu 10 WBC/ μl eine gute Linearität. Graldi et al. berichteten 1999 unter Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine Nachweisgrenze von 0,01 WBC/ml und eine Zählausebeute von 87,1%. Die Nageotte-Kammer wird allerdings heute oft nur noch bei Mangel eines Durchflusszytometers oder für Validierungen verwendet [Beckman et al. 2004].

Mehrere Autoren formulierten, dass die Durchflusszytometrie unter Verwendung monoklonaler AK auch eine geeignete Methode zur Quantifizierung kleiner Zellkonzentrationen ist. Sie erreichten z.B. Sensitivitätsgrenzen zwischen 0,1 und 5 WBC/ μl [Dzik et al. 1990, Lutz und Dzik 1993, Rebulla und Dzik 1994, Vachula et al. 1993]. Durch die starke Konzentrierung der Messprobe gab Masse 2001 eine Nachweisgrenze im Plasma von 0,5 Zellen/ml an.

Dzik et al. verglichen 2000 die Methoden der Mikrofluorometrie, Durchflusszytometrie und Nageotte-Kammer. Die automatischen Methoden zeigten Vorteile in der Präzision gegenüber der Kammerzählung. Dies lag zum einen am größeren Messvolumen der Probe und zum anderen an der subjektiven Erfahrung des Untersuchers mit der Schwierigkeit bei mikroskopischen Techniken, geschädigte WBC und angehäuften Trümmer zu unterscheiden. Auch van der Meer et al. verglichen 2001 diese Methoden und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Dijkstra-Tiekstra et al. stellten 2004a dar, dass die Anforderungen für Akkuratess und Präzision bei 10,0 WBC/ μl und höher erreicht werden. Keines der teilnehmenden Labore hier schaffte dies bei einem Level von 3,3 WBC/ μl . Die Nachweisgrenze war 0,3 WBC/ μl und die 95% PI lag zwischen 2,0-4,8 WBC/ μl . Chabanal et al. zeigten 2003 nach 30-facher Konzentration des Plasma eine Nachweisgrenze mit der Nageotte-Kammer bei 667 WBC/l und mit dem Durchflusszytometer bei 533 WBC/l, das Quantifikationslimit lag bei 6 WBC/ml bzw. 3 WBC/ml.

Alleinige quantitative Zellzählungen von intakten Zellen zur Qualitätskontrolle und zur immunologischen Bewertung von Plasma sind aufgrund oben genannter Probleme der Zellmessung und besonders durch die strukturelle Zerstörung großer Zellmengen durch die Gefrierkonservierung nicht ausreichend. Der Nachweis von membranhaltigen immunogenen Antigenstrukturen kann hierfür schon eher zuverlässigere Aussagen machen und erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines Immunoassays nach dem Testprinzip des MAIPA. Die MAIPA-Technik wurde erstmals von *Kiefel et al.* 1987 entwickelt und wird heute am häufigsten für das Screening und die Identifikation von plättchenspezifischen AK genutzt. Sie ist sensitiv und spezifisch. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Zellen im Gegensatz zu anderen Messmethoden gerade eben nicht intakt sein müssen. Der glykoproteinspezifische Enzymimmunoassay weist auch diverse antigenhaltige Membranbruchteile nach. Dies macht die Methode relativ unabhängig vom Alter der Plasmaprobe und ob die Probe vorher eingefroren war (FFP) oder frisch gemessen wurde. Nachteil des Testes sind der relativ große Zeitaufwand und die größere Menge an benötigtem Probenmaterial je nach Anzahl der verwendeten GP.

In dieser Arbeit wurden mit dem Immunoassay unter Verwendung von anti-CD16 in den Plasmen keine granulozytären Antigene nachgewiesen. In Anlehnung an die Methode des MAIPA wurde 1993 von *Bux et al.* ein entsprechender Ansatz zur Testung von granulozytären AK entwickelt (MAIGA). Die Bindung von Auto-AK an CD16 konnte dort gezeigt werden. Allerdings sind granulozytäre Messungen diffiziler, da im Gegensatz zu RBC und PLT die Granulozyten nicht ohne eine Aktivierung mit folgender Autolyse, als Resultat der Freisetzung von Enzymen und Sauerstoffradikalen aus den Granula, gelagert werden können. *Bux et al.* folgerten 1999, dass nur frisch isolierte Granulozyten für AK-Screenings verwendet werden können. Die Tatsache, dass 0,1% der europäischen Bevölkerung das CD16-Gen auf ihren Neutrophilen nicht tragen [*Fromont et al.* 1992] spielt hierfür wohl eher eine untergeordnete Rolle. Eine klare Aussage, ob wirklich überhaupt keine granulozytären Antigene in den Plasmen vorhanden waren oder ob der Nachweis in diesen Untersuchungen nicht effektiv gelungen ist, kann nicht bewertet werden.

Für den Nachweis von erythrozytären Antigenen entwickelte *Petty* 1993 die Methode des MAIEA, die ebenfalls vom MAIPA abgeleitet wurde. Auf RBC wird das Blutgruppenantigen „Indian“ von CD44 getragen [*Spring et al.* 1988]. *Petty et al.* gelang es 1997, positive Ergebnisse mit anti-CD44 im MAIEA zu erhalten. In dieser

Arbeit konnte kein CD44 bei sämtlichen Plasmen aufgezeigt werden. Eine Rolle dabei könnte möglicherweise spielen, dass CD44 auf RBC bei Anwesenheit des In(Lu)-Gen nicht exprimiert wird [Telen 1995].

Klar nachweisbar hingegen waren in unterschiedlichen Größenordnungen HLA-Kl. I durch anti- β_2 -Mikroglobulin und HPA durch anti-CD61 (GPIIIa). Zellmembrananteile von allen kernhaltigen Zellen, aber auch PLT, können HLA-Kl. I enthalten. Eine genauere Zelldifferenzierung ist hiermit aber nicht möglich. Der GPIIb-IIIa-Rezeptor ist spezifisch für PLT. Das GPIIIa trägt eine Reihe von Alloepitopen wie z.B. HPA-1a/b, HPA-4a/b, HPA-6bw, HPA-7bw [Rozman 2002]. Dieses GP ist ausschließlich auf ruhenden und aktivierten PLT zu finden, nicht aber auf WBC und RBC. Die zum Teil höheren Extinktionswerte von HPA gegenüber HLA-Kl. I bei derselben Plasmaprobe können unterschiedliche Ursachen haben. Eine Erklärung könnte die während der Apherese stattfindende Aktivierung der PLT sein, wofür wiederum die extrakorporale Blutzirkulation eine wesentliche Rolle spielt [Wun et al. 1992]. Nach Hagberg et al. 2000 ist eine PLT-Aktivierung mit einer verstärkten Exprimierung von GP IIb-IIIa-Antigenen u.a. neben Bildung von Mikrovesikeln und steigender Größe von PLT-Aggregaten verbunden. Durch den wechselnden Scherstress und die Biokompatibilität der Oberflächen variiert die Aktivierung der PLT bei der Herstellung auch mit verschiedenen Zellseparatoren deutlich.

Der Nachweis von immunogenem Restmaterial in hergestellten Plasmaprodukten spielt gerade dann eine entscheidende Rolle, wenn Patienten große Mengen an Plasma therapeutisch bedürfen, wie z.B. TTP-Patienten. George führte 2000 täglichen TPE mit dem 1-fachen Plasmavolumen durch. Eine Intensivierung der Therapie mit TPE 2x pro Tag oder der Austausch des 1,5-fachen Volumens waren möglich.

Primäres Therapieziel sind normale LDH-Werte und eine PLT-Zahl von $>150000/\mu\text{l}$ für mindestens 2-3 Tage [AABB]. Früher versuchte man zunächst die Behandlung der TTP mit Heparin, was sich aber als absolut ineffektiv herausstellte [Kelton 2002], da die TTP keine primäre Erkrankung der Gerinnung ist [Rock et al. 2000]. Rubenstein et al. beschrieben 1959 eine Remission nach Austausch mit frischem VB. Vor Einführung des intensiven TPE mit FFP 1979 war die Mortalität der Erkrankung $>90\%$ [Amorosi und Ullmann 1966]. Seitdem nahm diese deutlich ab, es konnte aber zum damaligen Zeitpunkt nicht gesagt werden, ob TPE einen toxischen Faktor

entfernt oder ob die Plasmainfusion einen mangelnden bzw. fehlenden Faktor ersetzt. Die therapeutische Wirksamkeit des TPE wird nach *Böhm et al. 2005* der Wiederherstellung der ADAMTS13-Aktivität durch Substitution des Enzyms und Entfernung der ADAMTS13-neutralisierenden IgG-Auto-AK zugeschrieben. Alternativ könnte TPE auch Faktoren aus dem Plasma entfernen, die das Endothelium stören, wie AK oder Zytokine (z.B. TNF- α). *Jimenez et al.* zeigten 2003 eine deutliche Abreicherung von endothelialen Mikropartikeln bereits nach der ersten Plasmabehandlung und eine zusätzliche Reduktion nach jedem weiteren Austausch. Möglicherweise eliminiert die erste Plasmapherese große Mengen von endothelialen Mikropartikeln aus dem Kreislauf und die folgenden Prozeduren dann jeweils die wiederum neu freigesetzten. *Lara et al.* bestätigten 2001 die hohe Ansprechrate des TPE bei einer großen Kohortenanalyse von 126 Patienten mit TTP. 56% der Patienten sprachen komplett und 21% teilweise auf die Therapie an, die Rückfallquote betrug 13%. Nach *Clark et al. 1999* hat sich von 1981 bis 1997 die Zahl an TPE bei TTP versiebenfacht. Bei *Rizvi et al. 2000* traten allerdings in 30% der Fälle schwere Komplikationen inklusive zweier Todesfälle und in weiteren 31% leichte Komplikationen auf. Komplikationen beim TPE können durch den Katheter (z.B. Infektion, Thrombose, Pneumothorax) oder TR des Plasmas sein.

Rock et al. stellten 1991 die Wirksamkeit von TPE und Plasmainfusion bei der Behandlung der TTP mit letztlich größerem Erfolg durch TPE gegenüber, was auch *Bell et al. 1991* bestätigten. Der limitierende Faktor der Plasmainfusion ist die Volumenbelastung des Patienten, was durch eine möglicherweise bestehende Niereninsuffizienz noch zusätzlich begrenzt wird. Auch *Coppo et al.* verglichen 2003 die Wirksamkeit der high-dose Plasmainfusion (25-30 ml/kg pro Tag) mit dem TPE als first-line Therapie der TTP. Sie kamen zu dem Entschluss, dass die Plasmainfusion bei Mangel einer Austauschmöglichkeit eine effiziente Behandlung sein kann, aber die Gefahr der Volumenüberladung doch den TPE bevorzugt. Es traten bei *Reutter et al. 2001* bei 65,8% der Patienten allergische Reaktionen auf, davon mit FFP 71% und mit CSP 50%.

Die **cryosupernante Plasmafraktion** kann als spezielles Therapeutikum bei TTP eingesetzt werden, da ihr einerseits die großen vWF-Multimere fehlen und sie andererseits die nötige vWF-Depolymerase-Aktivität liefert [*Allford et al. 2000, Blackall et al. 2001*]. Schon *Byrnes und Khurana* berichteten 1977 von diesen günstigen Effekten. *Moake et al.* zeigten 1985 die gleiche Behandlungseffektivität

von CSP wie FFP. Beide begünstigen das schnelle Verschwinden der großen Multimere in vivo, wobei weder FFP noch CSP die großen vWF-Multimere in die kleineren vWF-Formen direkt umwandeln können. Zunächst wurde CSP oft nur bei Patienten eingesetzt, die gegenüber FFP refraktär waren. *Owens et al.* erkannten jedoch 1995 in einer retrospektiven Studie, dass die Gruppe mit CSP-Therapie Überlebensvorteile gegenüber der Gruppe mit FFP hatte. *Rock et al.* untersuchten 1996 in einer Pilotstudie die Ansprech- und Überlebensrate mit CSP von 40 vorher unbehandelten Patienten. Beide waren mit 75% bzw. 95% nach einem Monat signifikant unterschiedlich zu denen mit FFP-Behandlung (44% bzw. 67%) in den gleichen Zentren. *Rock et al.* relativierten allerdings 2005 diese Aussage und kamen da zu dem Schluss, dass CSP und FFP bei der Mortalität nach 1 Monat und dem PLT-Anstieg nicht signifikant differieren und daher keinen Behandlungsvorteil bei TTP hätten. Auch *Zeigler et al.* berichteten 2001 von ähnlichen Ergebnissen. Nach *Dodds 2001* ist die Zahl der PLT-Mikropartikel in FFP etwa 25x höher als in frischem Plasma und im CSP durch Volumenreduzierung sogar 250x so hoch.

Beim Vergleich von **MB-Plasma** und FFP als Austauschmaterial fanden *Alvarez-Larrán et al. 2004* deutliche Nachteile auf Seiten von MB-Plasma, dadurch dass in dieser Gruppe ein höheres Sterberisiko, eine höhere Rückfallrate und eine niedrigere Remissionswahrscheinlichkeit auftraten. Dies wird unter anderem photooxidativen Schäden im Fibrinogenmolekül zugeschrieben. Die Autoren haben die Frage offen gelassen, ob sogar eventuell unidentifizierte, durch MB zerstörte Plasmakomponenten bei der Pathogenese von TTP mitwirken könnten. In einer Studie von *de la Rubia et al.* waren 2001 bei Verwendung von MB-Plasma durchschnittlich auch eine größere Anzahl an TPE, höhere Plasmavolumina bis zur Remission und längere Krankenhausaufenthalte nötig.

Der erfolgreiche Einsatz von **SD-Plasma** bei TTP wurde z.B. von *Moake et al. 1994*, *Horowitz und Pehta 1998* und *Evans et al. 1999* beschrieben. Als Vorteil zu FFP wird die fehlende Kontamination mit Blutzellen oder ihren Membrantigenen angesehen [*Wiedling et al. 1993*, *Beck et al. 2000*]. Aus noch unbekannten Gründen fehlt es dem SD-Plasma, durch den Produktionsprozess verursacht, ebenso an den großen vWF-Multimeren wie dem CSP [*Pamphilon 2000*]. *Blackall et al.* dachten 2001, dass SD-Plasma das therapeutische Äquivalent von CSP darstellen kann. Zusätzlich bringt SD-Plasma eine Sicherheit in Bezug auf lipid-umhüllte Viren mit [*Barz et al. 2002a*]. Virusinaktiviertes Plasma könnte nach *Yarranton et al. 2004* neben der Tatsache

einer Antikörperdilution durch das Pooling und somit einem verminderten Potential an allergischen Reaktionen zusätzlich den Vorteil eines reduzierten Risikos von transfusionsbedingten Infektionen haben. In ihren Untersuchungen zeigten auch virusinaktivierte Plasmen keinen Unterschied im Gehalt an ADAMTS13-Proteinase im Vergleich zu CSP und FFP. *Harrison et al.* berichteten 1996 bei einem auf die übliche Austauschtherapie refraktären Patienten mit SD-Plasma eine anhaltende Remission. *Barz et al.* konnten 2002b ein Mädchen mit kongenitaler TTP, das nach anfangs erfolgreicher Behandlung regelmäßig mit allergischen Reaktionen auf FFP reagierte, durch den Wechsel des Austauschmediums zu SD-Plasma erfolgreich und ohne Nebenwirkungen weiterbehandeln. Ein Beweis, dass gerade gegen zellkontaminiertes Plasma sensibilisierte Patienten durch den Einsatz von zellfreiem SD-Plasma stark profitieren.

Barbot et al. 2001 sowie *Sivakumaran und Roland* 2002 beschrieben allerdings auch Fallbeispiele von Patienten mit chronischer TTP, die Langzeittherapien mit **FFP** (160 Einheiten in 10 Jahren bzw. 650 Einheiten in 23 Jahren) ohne jegliche TR überstanden. Sie hielten die prophylaktische Langzeitbehandlung mit FFP für durchführbar, effektiv und relativ sicher. Während *Barz* 1994 davon ausging, dass Patienten, die eine Langzeittransfusionstherapie sowohl von zellulären als auch plasmatischen BK erhalten, mit zunehmender Transfusionsanzahl eine Transfusionsstörung erleben.

Zheng et al. beschrieben 2004 den Zusammenhang der ADAMTS13-Metalloproteinaseaktivität mit Mortalitätsraten der TTP und deren erfolgreiche Behandlungsmöglichkeit durch TPE. Auch *Mori et al.* 2002 und *Raife et al.* 2004 waren der Ansicht, dass die ADAMTS13-Aktivität eine prognostisch wichtige Rolle spielt. *Peyvandi et al.* formulierten 2004 wiederum, dass die Messung der ADAMTS13-Aktivität im Plasma für die Diagnose TTP nur in begrenztem Maße hilfreich ist. *Moake* führte 2002 die Effektivität der TPE auf die Entfernung der Auto-AK und Zuführung der mangelnden ADAMTS13-Protease zurück. *Rock et al.* beschrieben 2005 keine Korrelation von Proteinaseaktivität und Inhibitornachweis. Auch eine Aktivität von 5% kann schon zur Entfernung der meisten großen vWF-Multimere ausreichen. *Kremer-Hovinga et al.* konnten 2004a bestätigen, dass Patienten mit ADAMTS13-Inhibitoren auf die Therapie mit TPE positiv reagierten, obwohl deren Inhibitortiter hoch und die Aktivität kaum messbar blieben. Im Gegensatz zu den oben genannten hat sich die Mortalität bei einigen Formen, wie z.B. TTP im

Zusammenhang mit einer KMT, Chemotherapie oder bestimmter Medikamente kaum oder nicht verbessert. Die Tatsache, dass oft schwere Grunderkrankungen vorliegen und die Mikroangiopathie eine Folge dieser ist, kann für das fehlende Ansprechen von TPE eine Rolle spielen. *Vesely et al.* hielten 2003 trotz unterschiedlicher Ansprechraten dennoch TPE bei allen klinisch diagnostizierten TTP-Patienten für indiziert. *Zheng et al.* sahen 2004, dass obwohl bei Patienten mit hohen Inhibitortitern oft ein verzögertes Ansprechen mit der TPE erreicht wird, eine zusätzliche immunsuppressive Therapie sinnvoll wäre. Auch für *Studt et al.* 2003 ist TPE die Therapie der Wahl bei akuter erworbener TTP, wohingegen sie bei angeborener TTP regelmäßige Plasmainfusionen alle 2-3 Wochen für angemessen und ausreichend hielten.

Die Bedeutung anderer therapeutischer Maßnahmen einschließlich Kortikosteroiden, Gerinnungshemmer, Vincristin, Cyclosporin, iv-IgG, Splenektomie und Immunadsorption mit Protein A-Säulen ist noch nicht klar bewiesen [*Barz et al.* 2002a]. Einzelne erfolgreiche Fälle sind in der Literatur jedoch beschrieben. *Valbonesi* setzte die Methode der Kaskadenfiltration erfolgreich ein. *Gaddis et al.* berichteten 1997 über den Therapieerfolg von TPE-refraktärer TTP durch Immunadsorption an Protein A-Säulen mit Entfernung von Immunkomplexen, anti-PLT bzw. antiendothelzell-AK. Auch *Snyder et al.* waren auf diese Weise 1993 bei krebs-assoziiertem TTP erfolgreich. *Kremer-Hovinga* zeigten 2004b die Möglichkeit einer Behandlung einer plasmarefraktären oder rückgekehrten TTP mit Durchführung einer Splenektomie. *Ziman et al.* erreichten 2005 durch die initiale Kombination von TPE und die Gabe von Vincristin in ihren Untersuchungen eine Überlebensrate von 100% und auch *Ferrara et al.* beschrieben 2002 die Wirksamkeit von Vincristin bei der Behandlung von TTP. *Hand et al.* berichteten 1998 über einen erfolgreichen Einsatz von Cyclosporin A bei refraktärer TTP und *Yomtovian et al.* veröffentlichten 2004 den erfolgreichen Einsatz von Rituximab bei einem refraktären Patienten aufgrund von ADAMTS13-Inhibitoren, trotz zuvor erfolgter Behandlung mit TPE, Steroiden, Vincristin, Immunadsorption und Splenektomie ohne anhaltende Remission.

Zukünftig könnte eventuell durch Herstellung und Extrahierung des reinen Enzyms der Metalloproteinase eine Therapiealternative zur TPE existieren und damit vielleicht für Patienten mit angeborenem oder erworbenem Mangel den hohen Bedarf an Plasmapräparaten mit all seinen Problemen einschränken.

7 Schlussfolgerungen

Besonders Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen, Transplantatempfänger und Langzeittransfundierte können auf antigenhaltige Plasmen mit Unverträglichkeit, Antikörperboosterung oder -neubildung reagieren und profitieren stark vom Einsatz zellarmer oder gar zellfreier Plasmaprodukte.

Mit dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass in Einzelspenderplasmen aus der Herstellung mit ausschließlich zentrifugierenden Zellseparatoren häufig genügend Restzellen bzw. Zellbruchstücke verschiedener membranständiger Antigene vorhanden sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass diese Zellreste in vielen dieser Einzelspenderplasmen ein genügend hohes immunogenes Potential beinhalten und damit für die Plasmabehandlung bei Erkrankungen wie TTP ungeeignet sind. Eine zusätzliche Filterung dieser Aphereseplasmen z.B. mit dem PLAS4 verbessert deren Qualität deutlich.

Dieses Ergebnis stellt zumindest die Frage in den Raum, ob es nicht sogar sinnvoll ist, generell alle Plasmen trotz der zusätzlichen Kosten einer Filterung zu unterziehen. Plasma aus den Herstellungsverfahren mit Filtermembranen und inline-filtrierte Einzelspenderplasmen aus der Vollblutgewinnung sind neben zellfreiem SD-Plasma für den Einsatz als Austauschmedium aufgrund unserer Resultate wesentlich besser geeignet.

Diese Arbeit gibt dazu Anlass, dass auch die Deklaration von Blutplasma als prinzipiell „zellfrei“ kritisch überdacht werden sollte.

Die Zell- und Zellfragmentfreiheit der Plasmen vermindert nicht nur die Gefahr der Alloimmunisierung, TRALI und anderer zellabhängiger Komplikationen beim Empfänger, sondern auch das Risiko der Übertragung von zellabhängigen Parasiten, Viren und Prionen.

Daher ist auch in Deutschland die WBC-Depletion für Blutplasma generell zu fordern.

8 Literaturverzeichnis

1. **AABB** Technical Manual. Apheresis. Bethesda, Maryland. American Association of Blood Banks: p. 129-147.
2. **Allford** SL, Harrison P, Lawrie AS, Liesner R, Mackie IJ, Machin SJ. **2000**. Von Willebrand factor-cleaving activity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 111: 1215-1222.
3. **Alvarez-Larran** A, Del Rio J, Ramirez C, Albo C, Pena F, Campos A, Cid J, Muncunill J, Sastre JL, Sanz C, Pereira A. **2004**. Methylene blue-photo-inactivated plasma as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang* 86: 246-251.
4. **Amorosi** EL, **Ultmann** JE. **1966**. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 45: 139-159.
5. **Andersen** KC, **Weinstein** HJ. **1990**. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 323: 315-321.
6. **Asada** Y, Sumiyoshi, A, Hayashi T, Suzumija J, Kaketani K. **1985**. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to Factor VIII related antigen. *Thromb Res* 38: 469-479.
7. **Askari** S, Nollet K, Debol SM, Brunstein CG, Eastlund T. **2002**. Transfusion-related acute lung injury during plasma exchange: Suspecting the unsuspected. *J Clin Apheresis* 17: 93-96.
8. **Barbot** J, Costa E, Guerra M, Barreirinho A, Isvarlal P, Robles R, Gerritsen HE, Lämmle B, Furlan M. **2001**. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol* 113: 649-651.
9. **Barnard** RD. **1951**. Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *NY State J Med* 51: 2399-2402.
10. **Barz** D. **1994**. Detection of antigen structures in blood cells in various prepared plasma transfusions. *Anaesthesiol Reanim* 19(6): 155-158.
11. **Barz** D, Budde U, Hellstern P. **2002a**. Therapeutic plasma exchange and plasma infusion in thrombotic microvascular syndromes. *Thromb Res* 107: S23-27.
12. **Barz** D, Kentouche K, Zintl F, Göhler T, Budde U. **2002b**. Treatment with solvent detergent (SD) treated plasma is efficacious and well tolerated in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) due to congenital von Willebrand factor-cleaving protease (vWF-CP)-deficiency. *Vox Sang* 83 (S2): 99.

13. **Beck KH, Mortelmans Y, Kretschmer V, Höltermann W, Lukasewitz P. 2000.** Comparison of Solvent/Detergent-Inactivated Plasma and Fresh Frozen Plasma under Routine Clinical Conditions. *Infus Ther Transfus Med* 27: 144-148.
14. **Beckman N, Sher G, Masse M, Richter E, Ringwald J, Rebullia P, van der Meer P, Justica B, Walker B, Rowe G. 2004.** Review of the Quality Monitoring Methods Used by Countries Using of Implementing Universal Leukoreduction. *Transfus Med Rev* 18(1): 25-35.
15. **Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. 1991.** Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med* 325: 398-403.
16. **Bernvil S, Abdulatiff M, Al-Sedairy S, Sasich F, Sheth K. 1994.** Fresh Frozen Plasma contains viable progenitor cells-should we irradiate? *Vox Sang* 67: 405.
17. **Blackall DP, Uhl L, Spitalnik SL. 2001.** Cryoprecipitate-reduced plasma: rationale for use and efficacy in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 41: 840-844.
18. **Böhm M, Betz C, Miesbach W, Krause M, von Auer C, Geiger H, Scharrer I. 2005.** The course of ADAMTS13 activity and inhibitor titre in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma exchange and vincristine. *Br J Haematol* 129: 644-652.
19. **Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA. 1994.** Biologic Effects of Leukocytes Present in Transfused Cellular Blood Products. *Blood* 84(6): 1703-1721.
20. **Bowden R, Cays M, Schoch G, Sayers M, Slichter S, Welk K, Haake R, McCullough J, Weisdorf D, Miller W. 1995.** Comparison of filtered blood to seronegative blood products for prevention of cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 78: 246-250.
21. **Bowden R, Sayers M. 1990.** The risk of transmitting cytomegalovirus infection by fresh frozen plasma. *Transfusion*. 30(8): 762-763.
22. **Brailey LL, Brecher ME, Bandarenko N. 1999.** Apheresis and the Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Syndrome: Current Advances in Diagnosis, Pathophysiology, and Management. *Ther Apher* 3(1): 20-24.
23. **Brand A, Claas FHJ, Voogt PJ, Wasser MNJM, Eernisse JG. 1988.** Alloimmunization after leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusions. *Vox Sang* 54: 160.
24. **Burkhardt T, Kappelsberger C, Karl M. 2001.** Evaluation of a new combined centrifugation/ filtration method for the collection of plasma via plasmapheresis.
25. **Burnouf T, Kappelsberger C, Frank K, Burkhardt T. 2003.** Residual cell content in plasma produced by three centrifugal apheresis procedures. *Transfusion* 43: 1522-1526.
26. **Bux J. 2005.** Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang* 89: 1-10.

27. **Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A. 1996.** Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol* 93: 707-713.
28. **Bux J, Kissel K, Hofmann C, Santoso S. 1999.** The Use of Allele-Specific Recombinant Fcγ Receptor IIIb Antigens for the Detection of Granulocyte Antibodies. *Blood* 93: 357-362.
29. **Bux J, Kober B, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. 1993.** Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens (MAIGA). *Transfus Med* 3: 157.
30. **Byrnes JJ, Khurana M. 1977.** Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. *N Engl J Med* 297: 1386-1389.
31. **Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, Krailadsiri P, Seghatchian J, Beard M, Beckman N, Williamson LM. 2001.** The effect of leucocyte depletion on the quality of fresh-frozen plasma. *Br J Haematol* 114: 233-240.
32. **Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, Swann K, Stenning M, Seghatchian MJ, Williamson LM. 1999.** Evaluation of a novel filter for leucocyte depletion of fresh plasma. *Transfus Med* 9: 47.
33. **Chabanal A, Sensebe I, Masse M, Maurel JP, Plante J, Hivet D, Kannengieser C, Naegelen C, Joussemet M, Marchesseau B, Rasongles P, Proust F, David C, Montembault AM, Bergeat P. 2003.** Quality assessment of seven types of fresh-frozen plasma leucoreduced by specific plasma filtration. *Vox Sang* 84: 308-317.
34. **Claas FHJ, Smeenk RJT, van Steenbrughe GJ, Eernisse JG. 1981.** Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusions is due to the contaminating leukocytes in the platelet suspension. *Exp Hematol* 9(1): 84-89.
35. **Clark WF, Rock GA, Buskard N, Shumak KH, LeBlond P, Anderson D, Sutton DM. 1999.** Therapeutic Plasma Exchange: An Update from the Canadian Apheresis Group. *Ann Intern Med* 131: 453-462.
36. **Coppo P, Bussel A, Charrier D, Adrie C, Galicier L, Boulanger E, Veyradier A, Leblanc T, Alberti C, Azoulay E, Le Gall JR, Schlemmer B. 2003.** High-dose plasma infusion versus plasma exchange as early treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic syndrome. *Medicine* 82(1): 27-38.
37. **Culty M, Miyake K, Kincade PW, Sikorski E, Butcher EC, Underhill C. 1990.** The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 111: 2765-2774.
38. **Dieter J, Husser M, Kunas G, Gudino M. 1998.** Plasma collected with the autophoresis C is virtually white blood cell free. Abstract 44th annual Conference ASAIO/CVST.
39. **Dijkstra-Tiekstra MJ, van der Meer PF, Pietersz RNI, de Wildt-Eggen J. 2004a.** Multicenter evaluation of two flow cytometric methods for counting low levels of white blood cell. *Transfusion* 44: 1319-1324.

40. **Dijkstra-Tiekstra** MJ, van der Schoot CE, Pietersz RNI, Huijgens PC, van der Meer PF, Reesink HW. **2004b**. Development of white blood cell fragments, during the preparation and storage of platelet concentrates, as measured by using real-time polymerase chain reaction. *Vox Sang* 87(4): 250-256.
41. **Dodds** WJ. **2001**. Platelets and Leukocytes in Blood Components. Vita-Tech. Veterinary Diagnostic Services
42. **Dong** JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. **2002**. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100: 4033-4039.
43. **Dooren** MC, Owehand WH, Verhoeven AJ, von dem Borne AE, Kuijpers RW. **1998**. Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gammaglobulin concentrate and monocytoreactive IgG antibodies. *Lancet* 352:1601-1602.
44. **Dzik** S. **1999**. Counting Low Numbers of Leukocytes in Leukoreduced Blood Components. *Infus Ther Transfus Med* 26: 62-65.
45. **Dzik** S, Moroff G, Dumont L. **2000**. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry. *Transfusion* 40: 513-520.
46. **Dzik** WH, Ragosta A, Cusack WF. **1990**. Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products. *Vox Sang* 59(3): 153-159.
47. **Eckstein** R. **2001**. Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 4. Auflage. URBAN&FISCHER-Verlag
48. **Engelfriet** CP, **Reesink** HW. **2001**. Transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sang* 81: 269-283.
49. **Evans** G, Llewelyn C, Luddington R, Baglin TP, Williamson LM. **1999**. Solvent/detergent fresh frozen plasma as primary treatment of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Lab Haem* 21:119-123.
50. **Ferrara** F, Annunziata M, Ollio F, Palmieri S, Copia C, Mele G, Pocal B, Schiavone EM. **2002**. Vincristine as treatment for recurrent episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 81: 7-10.
51. **Fromont** P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P. **1992**. Frequency of the polymorphonuclear Fc gamma receptor III deficiency in the french population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood* 79: 2131.
52. **Furlan** M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B. **1998**. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 339: 1578-1584.

53. **Gaddis** TG, Guthrie THJ, Drew MJ, Sahud M, Howe RB, Mittelman A. **1997**. Treatment of plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with protein A immunoabsorption. *Am J Hematol* 55: 55-58.
54. **George** JN. **2000**. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood* 96: 1223-1229.
55. **Graldi** G, Matteucci G, Riverberi R. **1999**. Leukocyte Counting with the Nageotte Hemocytometer: Use of Fluorescence Microscopy. *Infus Ther Transfus Med* 26: 222-225.
56. **Gregori** L, McCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemimo-Coker SO, Gailivi A, Rohwer RG. **2004**. Effectiveness of leukoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalitis from blood. *Lancet* 364: 529-531.
57. **Gutensohn** K, Alisch A, Krueger W, Kroeger N, Kuehnl P. **2000**. Extracorporeal Plateletpheresis Induces the Interaction of Activated Platelets with White Blood Cells. *Vox Sang* 78: 101-105.
58. **Hagberg** IA, Akkok CA, Lyberg T, Kjeldsen-Kragh J. **2000**. Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators. *Transfusion* 40: 182-192.
59. **Hand** JP, Lawlor ER, Yong CKK, Davis JH. **1998**. Successful use of cyclosporine A in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 100: 597-599.
60. **Harrison** CN, Lawrie AS, Iqbal A, Hunter A, Machin SJ. **1996**. Plasma exchange with solvent/detergent-treated plasma of resistant thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 94(4): 756-758.
61. **Heddle** NM. **1999**. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol* 6(6): 420-426.
62. **Heddle** NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, Kelton JG. **1994**. The role of plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med* 331: 670-671.
63. **Hellstern** P, **Haubelt** H. **2002**. Manufacture and composition of fresh frozen plasma and virus-inactivated therapeutic plasma preparations: correlation between composition and therapeutic efficacy. *Thromb Res* 107: S 3-8.
64. **Hiruma** K, **Okuyama** Y. **2001**. Effect of leucocyte reduction on the potential alloimmunogenicity of leucocytes in fresh-frozen plasma products. *Vox Sang* 80: 51-56.
65. **Horowitz** MS, **Pehta** JC. **1998**. SD Plasma in TTP and coagulation factor deficiencies for which no concentrates are available. *Vox Sang* 74: 231-235.
66. **Horowitz** B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH. **1985**. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl) phosphate detergent combination. *Transfusion* 25: 516-522.

67. **Huizinga** TWA, Kleijer M, Tetteroo PAT, Roos D, von dem Borne AE. **1990**. Biallelic neutrophil NA antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fcγ-receptor III (CD16). *Blood* 75: 213.
68. **Insunza** A, Romon I, Gonzalez-Ponte ML, Hoyos A, Pastor JM, Iriando A, Hermosa V. **2004**. Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfus Med* 14: 157-164.
69. **Ironside** JW, **Head** MW. **2004**. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood and blood products. *Haemophilia* 10: 64-69.
70. **Jimenez** JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. **2003**. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol* 123: 896-902.
71. **Jones** RG, Faust A, Glazier J, Matthews R, Potter B. **1998**. Cell-Dyn 4000: Utility within the core laboratory structure and preliminary comparison of its expanded differential with the 400-cell manual differential count. *Lab Hematol* 4: 34-44.
72. **Kelton** JG. **2002**. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome: will recent insight into pathogenesis translate into better treatment? *Transfusion* 42: 388-391.
73. **Kiefel** V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. **1987**. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 70(6): 1722-1726.
74. **Kientz** D. **2001**. Evaluation of a new filtering core bowl for the collection of fresh frozen plasma.
75. **King** KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. **2004**. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs. *Transfusion* 44: 25-29.
76. **Kleinman** S, Caulfield T, Chan P, Davenport R, McFarland J, McPhedran S, Meade M, Morrison D, Pinsent T, Robillard P, Slinger P. **2004**. Review: Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 44: 1774-1789.
77. **Kopko** PM, Paglieroni TG, Popovsky MA, Muto KN, Mackenzie MR, Holland PV. **2003**. TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion* 43: 177-184.
78. **Kremer-Hovinga** JA, Studt JD, Alberio L, Lämmle B. **2004a**. Von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 activity determination in diagnosis of thrombotic microangiopathies: the Swiss experience. *Semin Hematol* 41:75-82.
79. **Kremer-Hovinga** JA, Studt JD, Demarmels-Biasiutti F, Solenthaler M, Alberio L, Zwicky C, Fontana S, Mansouri-Taleghani B, Tobler A, Lämmle B. **2004b**. Splenectomy in relapsing and plasma-refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 89: 320-324.

80. **Kretschmer V. 1991.** Comparison of different plateletpheresis systems. *Infusionsther* 18: 188-195.
81. **Kunas G, Kandler R, Husser M, Gudino M. 1998.** Characterization of blood cell content in plasma collected for the manufacture of plasma derivatives using two apheresis technologies. Abstract 44th annual Conference ASAIO/CVST.
82. **Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf J, Schmitt H. 1991.** Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 60: 207-213.
83. **Lara PN, Coe TL, Zhou H, Fernando L, Holland PV, Wun T. 2001.** Improved survival with plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Am J Med* 107(6): 573-579.
84. **Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 2003.** Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. 3. Auflage. Deutscher-Ärzte- Verlag, Köln.
85. **Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. 2001.** Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413: 488-494.
86. **Ljungman P. 2004.** Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction. *Br J Haematol* 125: 107-116.
87. **Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. 2004.** Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob- disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421.
88. **Lutz P, Dzik WH. 1993.** Large-volume hemocytometer chamber for accurate counting of white cells (WBCs) in WBC-reduced platelets: validation and application for quality control of WBC-reduced platelets prepared by apheresis and filtration. *Transfusion* 33(5): 409.
89. **van Marwijk Kooy M, von Prooijen HC, Moes M, Bosma-Stants I, Akkerman JWN. 1991.** Use of Leukocyte-Depleted Platelet Concentrates for the Prevention of Refractoriness and Primary HLA Alloimmunization A Prospective, Randomized Trial. *Blood* 77(1): 201-205.
90. **Masse M. 2001.** Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Transfus Clin Biol* 8(3): 297-302.
91. **Masse M, Naegelen C, Pellegrini N, Marpaux N, Beaujean F. 1992.** Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets. *Transfusion* 32: 565-571.
92. **van der Meer PF, Gratama JW, van Delden CJ, Laport RF, Levering WH, Schrijver JG, Tiekstra MJ, Keeney M, de Wildt-Eggen J. 2001.** Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. *Br J Haematol* 115(4): 953-962.

93. **van der Meer** PF, Pietersz RNI, Hinloopen B, Dekker WJA, Reesink HW. **1999**. Automated Separation of Whole Blood in Top and Bottom Bags into Components Using the Compamat G4. *Vox Sang* 76(2): 90-99.
94. **Moake** JL. **2002**. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 347: 589-600.
95. **Moake** JL, Byrnes JJ, Troll JH, Rudy CK, Hong SL, Weinstein MJ, Colannino NM. **1985**. Effects of fresh-frozen plasma and its cryosupernatant fraction on von Willebrand factor multimeric forms in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 65: 1232-1236.
96. **Moake** J, Chintagumpala M, Turner N, McPherson P, Nolasco L, Steuber C, Santiago-Borrero P, Horowitz M, Pehta J. **1994**. Solvent/detergent-treated plasma suppresses shear-induced platelet aggregation and prevents episodes of TTP. *Blood* 84: 490-497.
97. **Moog** R, Zeiler T, Heuft HG, Stephan B, Fischer EG, Kretschmer V, Rödel-Spieker R, Strasser S, Zingsem J. **2003**. Collection of WBC-reduced single-donor PLT concentrates with a new blood cell separator: results of a multicenter study. *Transfusion* 43: 1107-1114.
98. **Mori** Y, Wada H, Gabazza C, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. **2002**. Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 42: 572-580.
99. **Moschcowitz** E. **1924**. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proceedings of the New York Pathological Society* 24: 21-24.
100. **Mueller-Eckhardt** (Hrsg). **1996**. Transfusionsmedizin. 2.Auflage. Springer-Verlag.
101. **Mueller-Eckhardt und Kiefel** (Hrsg). **2004**. Transfusionsmedizin. 3.Auflage. Springer-Verlag.
102. **Murphy** MF. **1999**. New variant Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD): the risk of transmission by blood transfusion and the potential benefit of leukocyte-reduction of blood components. *Transfus Med Rev* 13: 75-83.
103. **Murphy** MF, Stevens W, Green ES, Allison P, Smith D. **1998**. Universal leukocyte depletion of blood components. *Infus Ther Transfus Med* 25: 305-311.
104. **Myers** L. **2002**. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: Pathophysiology and management. *Nephrol Nurs J* 29: 171-180.
105. **Nagahashi** H, Yabusaki K, Matsui H, Hirono T, Yokokawa N, Satake M, Tadokoro K, Juji T. **2000**. Improved Sensitivity in the Measurement of Residual Leukocytes in Platelet Products Using an Automated Leukocyte Counter. *Vox Sang* 79: 34-39.
106. **Narvios** A, Figueredo G, Tarrand JJ, Huh YO, Lichtiger B. **2004**. Fresh Frozen Plasma Is Not a Cellular Blood Component: Transfusion Practice in Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Transplant Recipients. *Current Issues in Transfusion Medicine* 12(1).

107. **Nielsen** HJ, Reimert C, Pedersen AN, Dybkjoer E, Brünner N, Alsbjorn B, Stahl Skov P. **1997**. Leucocyte-derived bioactive substances in fresh frozen plasma. *Br J Haematol* 78: 548-552.
108. **Ohto** H, Yasuda H, Yokota M, Matsuoka T, Nomizu T. **2000**. HLA antibodies after transfusions of FFP. *Transfusion* 40: 613.
109. **Owens** MR, Sweeney JD, Tahhan RH, Fortkolt P. **1995**. Influence of type of exchange fluid on survival in therapeutic apheresis for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apheresis* 10(4): 178-182.
110. **Paglino** JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. **2004**. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion* 44: 16-24.
111. **Pamphilon** D. **2000**. Viral inactivation of fresh frozen plasma. *Br J Haematol* 109: 680-693.
112. **Patel** Y, Rahman S, Siddiqua A, Wilkinson JM, Kakkar VV, Authi KS. **1998**. Functional characterization of PM6/13, a beta3-specific (GPIIIa/CD61) monoclonal antibody that shows preferential inhibition of fibrinogen binding over fibronectin binding to activated human platelets. *Thromb Haemost* 79: 177-185.
113. **Paul-Ehrlich-Institut**. **2000**. Bundesanzeiger 174 vom 14.09.2000
114. **Paul-Ehrlich-Institut**. **2003**. Verkürzung der Quarantänelagerung von Frischplasma. Bundesanzeiger Nr. 60 vom 27.03.2003, S. 5620.
115. **Paul-Ehrlich-Institut**. **2005**. Maßnahme zur Risikovorsorge über die Zulassung und Registrierung von zellulären Blutprodukten und gefrorenem Frischplasma, Stufe II. Bundesanzeiger Nr. 85 vom 07.05.2005, S. 7128/7129).
116. **Pasqualetti** D, Ferrazza G, Vaglio S, Cardillo AM, Pupella S, Alimenti G, Salvagnini L, Girelli G. **2003**. Pre-storage Filtration of Fresh Frozen Plasma. *Transfusion* 43: S9-58.
117. **Peden** AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. **2004**. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364: 527-529.
118. **Perkins** HA, Payne R, Ferguson J, Wood M. **1966**. Nonhemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effects of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility of leukocytes. *Vox Sang* 11: 578-600.
119. **Petty** AC. **1993**. Monoclonal antibody-specific immobilisation of erythrocyte antigens (MAIEA): a new technique to selectively determine antigenic sites on red cell membranes. *J Immunol Meth* 161: 91-95.
120. **Petty** AC, Green CA, Daniels GL. **1997**. The monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigen assay (MAIEA) in the investigation of human red-cell antigens and their associated membrane proteins. *Transfus Med* 7: 179-188.

121. **Peyvandi F**, Ferrari S, Lavoretano S, Canciani MT, Mannucci PM. **2004**. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 127: 433-439.
122. **Piet MPJ**, Chin S, Prince AM. **1990**. The use of tri(n-butyl) phosphate detergent mixtures to inactivate hepatitis viruses and human immunodeficiency virus in plasma and plasma's subsequent fractionation. *Transfusion* 30: 591-598.
123. **Popovsky MA**. **2000**. Transfusion-related acute lung injury. *Curr Opin Hematol* 7: 402-407.
124. **Popovsky MA**, **Moore SB**. **1985**. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 25: 573-577.
125. **Prowse CV**, Hornsey VS, Drummond O, MacGregor IR, Pepper DS, Barclay GR, Bethel H, Walker B, Barnard G, Kirby L, Hope J. **1999**. Preliminary assessment of whole-blood, red-cell and platelet-leucodepleting filters for possible induction of prion release by leucocyte fragmentation during room temperature processing. *Br J Haematol* 106: 240-247.
126. **Raife T**, Atkinson B, Montgomery R, Vesely S, Friedman K. **2004**. Severe deficiency of vWF-cleaving protease (ADAMTS13) activity defines a distinct population of thrombotic microangiopathy patients. *Transfusion* 44: 146-150.
127. **Ramos RR**, Curtis BR, Duffy BF, Chaplin H. **1994**. Low retention of white cell fragments by polyester fiber white cell-reduction platelet filters. *Transfusion* 34: 31-34.
128. **Rebulla P**, **Dzik WH**. **1994**. Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-depleted red blood cells. *Vox Sang* 66: 25.
129. **Renaudier PC**, Vo Mai MP, Azanowsky JM, Breton P, Cheze S, Girard A, Hauser L, Legras JF, Rebibo D, Waller C, Ounnoughene N. **2004**. Epidemiology of transfusion-related acute lung injury in Gifit, the French hemovigilance database. A study of the French hemovigilance network. *Transfusion* 44: 23A.
130. **Reutter JC**, Sanders KF, Brecher ME, Jones HG, Bandarenko N. **2001**. Incidence of allergic reactions with fresh frozen plasma or cryosupernatant plasma in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apheresis* 16(3): 134-138.
131. **Richtlinien** zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten. **2003**. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Institutes. Deutscher-Ärzte-Verlag, Köln.
132. **Rider JR**, Winter MA, Payrat JM, Mathias JM, Pamphilon DH. **1998**. Leucocytes Can Be Eliminated from Plasma by Filtration Prior to Viral Inactivation with Methylene Blue. *Vox Sang* 74: 209-210.
133. **Riggert J**, Schwartz DW, Wieding JU, Mayr WR, Kohler M. **1997**. Prestorage inline filtration of whole blood for obtaining white reduced blood components. *Transfusion* 37: 1039-1044.

134. **Ringwald J**, Zingsem J, Zimmermann R, Strasser E, Antoon M, Eckstein R. **2003**. First comparison of productivity and citrate donor load between the Trima version 4 (dual-stage filler) and the Trima Accel (single-stage filler) in the same donors. *Vox Sang* 85: 267-275.
135. **Rizvi MA**, Vesely SK, George JN, Chandler GL, Duvall D, Smith JW, Gilcher RO. **2000**. Complications of plasma exchange in 71 consecutive patients treated for clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Transfusion* 40: 896-901.
136. **Rock GA**, Anderson D, Clark W, Leblond P, Palmer D, Sternbach M, Sutton D, Wells G. **2005**. Does cryosupernatant plasma improve outcome in thrombotic thrombocytopenic purpura? No answer yet. *Br J Haematol* 129: 79-86.
137. **Rock GA**, Porta C, Bobbio-Pallavicini E. **2000**. Thrombotic thrombocytopenic purpura treatment in the year 2000. *Haematologica* 85: 410-419.
138. **Rock GA**, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spasoff RA. **1991**. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med* 325: 393-397.
139. **Rock G**, Shumak KH, Sutton DM, Buskard NA, Nair RC. **1996**. Cryosupernatant as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 94(2): 383-386.
140. **Rozman P**. **2002**. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol* 10: 165-181.
141. **Rubenstein MA**, Kagan BM, MacGillviray MH. **1959**. Unusual remission in a case of thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome following fresh blood exchange transfusions. *Ann Intern Med* 51: 1409-1419.
142. **de la Rubia J**, Arriaga F, Linares D, Larrea L, Carpio N, Marti ML, Sanz MA. **2001**. Role of methylene blue-treated or fresh-frozen plasma in the response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 114: 721-723.
143. **Saarinen UM**, Kekomäki R, Siimes MA, Myllylä G. **1990**. Effective Prophylaxis Against Platelet Refractoriness in Multitransfused Patients by Use of Leukocyte-Free Blood Components. *Blood* 75: 512-517.
144. **Sachse H**, Gehring W, Schwinn H. **1991**. Ein virusinaktiviertes Plasma zur Behandlung seltener Hämophilien. *Ann Haematol* 62: 162.
145. **Santamaria A**, Moya F, Martinez C, Martino R, Martinez-Perez J, Muniz-Diaz E. **1998**. Transfusion related acute lung injury associated with an NA1-specific antigranulocyte antibody. *Haematologica* 83: 951-952.
146. **Sensebé L et al**. **2000**. Filtration du Plasma, Validation du filtre Plasmaflex PLAS4. SFTS Paris

147. **Shiba M**, Tadokoro K, Sawanobori M, Nakajima K, Suzuki K, Juji T. **1997**. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removed filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 37: 457.
148. **Silliman CC**, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z. **2003**. Transfusion-related acute lung injury: Epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood* 101: 454-462.
149. **Sivakumaran M**. **2000**. Universal Leucodepletion and new-variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Br J Haematol* 110: 747-748.
150. **Sivakumaran M, Roland J**. **2002**. Prophylactic Treatment with Fresh-Frozen Plasma in Chronic Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol* 117: 480.
151. **Snyder HW**, Mittelman A, Oral A, Messerschmitt G, Henry DH, Korel S, Betram J, Guthrie TH, Ciarerella D, Wuest D, Perkins W, Balian JR, Cochran S, Peugeot R, Jones F. **1993**. Treatment of cancer chemotherapy associated thrombotic thrombocytopenic purpura / hemolytic uremic syndrome by protein A immunoabsorption of plasma. *Cancer* 71: 1882-1892.
152. **Spring FA**, Dalchau R, Daniels GL, Mallinson G, Judson PA, Parson Fabre JW, Anstee DJ. **1988**. The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein, 80,000 MW (the CD44w glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 64: 37-43.
153. **Steele BW**, Wu NC, Whitcomb C. **2001**. White Blood Cell and Platelet Counting Performance by Hematology Analysers: A Critical Evaluation. *Lab Hematol* 7: 255-266.
154. **Studt JD**, Kremer-Hovinga JA, Alberio L, Bianchi V, Lämmle B. **2003**. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in thrombotic microangiopathies: diagnostic experience 2001/2002 of a single research laboratory. *SWISS MED WKLY* 133: 325-332.
155. **Telen MJ**. **1995**. Lutheran antigenic CD44-related antigens, and Lutheran regulatory genes. *Transfus Clin Biol* 2: 291-301.
156. **Torok TJ**, Holman RC, Chorba TL. **1995**. Increasing mortality from thrombotic thrombocytopenic purpura in the United States – analysis of national mortality data 1961- 1991. *Am J Hematol* 50: 84-90.
157. **Toy P**, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM, McFarland JG, Nathens AB, Silliman CC, Stroncek D. **2005**. Transfusion-related acute lung injury: Definition and review. *Crit Care Med* 33: 721-726.
158. **Transfusionsgesetz** (Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens). BGB I Nr 42, 6. Juli **1998**, S 1752.
159. **Tsai H, Lian EC**. **1998**. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 339: 1585-1594.

160. **Turner ML. 2001.** Variant Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Curr Opin Hematol* 8: 372-379.
161. **Vachula M, Simpson SJ, Martinson JA, Aono FM, Hutchcraft AM, Balma DL, Van Epps DE. 1993.** A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components. *Transfusion* 33(3): 262-267.
162. **Valbonesi M, Bruni R, Florio G, Zanella A, Bunkens H. 2001.** Cellular contamination of plasma collected with various apheresis systems. *Transfus & Apher Sci* 24(1): 91-94.
163. **Vamvakas EC, Blajchman MA. 2001.** Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood* 97(5): 1150.
164. **Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake MA, Raskob GE. 2003.** ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood* 102: 60-68.
165. **Vrielink H, van der Meer P. 2004.** Collection of white blood cell-reduced plasma by apheresis. *Transfusion* 44: 917-923.
166. **Vrielink H, van der Meer P, Leuenberger C, Falaize S. 2001.** Leukodepleted plasma without a filter. Poster AABB
167. **Webert KE, Blajchman MA. 2003.** Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Transfus Med Rev* 17: 252-262.
168. **Wieding JU, Vehmeyer K, Dittman J. 1994.** Contamination of fresh frozen plasma with viable white cells and proliferative stem cells. *Transfusion* 34: 185-186.
169. **Willis JI, Lown JA, Simpson MC, Erber WN. 1998.** White cells in fresh-frozen plasma: evaluation of a new white cell-reduction filter. *Transfusion* 38(7): 645.
170. **Wun T, Paglieroni T, Sazama K, Holland P. 1992.** Detection of plasmapheresis-induced platelet activation using monoclonal antibodies. *Transfusion* 32: 534-540.
171. **Yarranton H, Lawrie AS, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ. 2004.** Comparison of von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor-cleaving protease and protein S in blood components used for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Med* 14: 39-44.
172. **Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM. 2004.** The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion* 44: 410-415.
173. **Yomtovian R, Niklinski W, Silver B, Sarode R, Tsai HM. 2004.** Rituximab for chronic recurring thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature. *Br J Haematol* 124(6): 787-795.

174. **Zeigler** ZR, Shadduck RK, Gryn JF, Rintels PB, George JN, Besa EC, Bodensteiner D, Silver B, Kramer RE. **2001**. Cryoprecipitate poor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *J Clin Apheresis* 16(1): 19-22.
175. **Zeiler** T, **Kretschmer** V. **2000**. Platelet Concentrates from Automated Apheresis- Past, Present and Future Developments. *Infus Ther Transfus Med* 27: 119-126.
176. **Zheng** XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. **2004**. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS 13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 103: 4043-4049.
177. **Ziman** A, Mitri M, Klapper E, Pepkowitz SH, Goldfinger D. **2005**. Combination vincristine and plasma exchange as initial therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: one institution's experience and review of the literature. *Transfusion* 45: 41-49.
178. **Zingsem** J, Weisbach V, Zeiler T, Zimmermann R, Neidhardt B, Eckstein R. **1994**. Are single-needle protocols equivalent to dual-needle protocols for platelet apheresis? *Beitr Infus Ther Transfus Med* 32: 328-333.
179. **Zingsem** J, Zimmermann R, Weisbach V, Glaser A, Bunkens H, Eckstein R. **2001**. Comparison of a new WBC-reduction system and the standard plateletpheresis protocol in the same donors. *Transfusion* 41: 396-400.
180. **Zupanska** B, Uhrynowska M, Konopka L. **1999**. Transfusion-related acute lung injury due to granulocyte agglutinating antibody in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 39: 944-947.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

1	Dichte und Größe der Blutbestandteile	12
2	Auswahl der monoklonalen Antikörper und Kontrollseren	21
3	Einteilung der Extinktionswerte nach deren Höhe in Untergruppen	33
4	Darstellung des Anteils an HLA Kl. I-positiven Plasmen in Prozent und Anzahl der Einzelplasmen in den jeweiligen Untergruppen	34
5	Darstellung des Anteils an HPA- positiven Plasmen in Prozent und Anzahl der Einzelplasmen in den jeweiligen Untergruppen	34
6	Abreicherung der Zellantigene in Prozent beim Immunoassay	37
7	Abreicherung der Zellen in Prozent beim Cell-Dyn 4000	41

9.2 Abbildungsverzeichnis

1	4-fach Beutelsystem mit integriertem WBC-Reduktionsfilter	10
2	Latham-Glocke	13
3	BMB	13
4	2-stufige Sammelkammer der Spectra	14
5	2-stufige Trima Version 4	14
6	Trennkammer der Excel PRO	15
7	C5-Kammer der COM.TEC	15
8	HSC-Glocke	16
9	FC-Glocke	16
10	Plasmacell-C der A200	17
11	Anzahl der Einzelproben der verschiedenen Herstellungsverfahren	28
12	Übersicht der Extinktionsmittelwerte mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern bei den verschiedenen Herstellungsverfahren	30
13	Darstellung der Mittelwerte und Ergebnisspannweiten von HLA-Kl. I	32
14	Darstellung der Mittelwerte und Ergebnisspannweiten von HPA	33
15	Vergleich der mittleren Extinktionen von HLA-Kl. I im Plasma des Spenders und im produzierten Plasma	35
16	Vergleich der mittleren Extinktionen von HPA im Plasma des Spenders und im produzierten Plasma	36
17	Darstellung der mittleren WBC-Zahlen ($\times 10^9/l$) und der Ergebnisspannweiten bei der Messung am Cell-Dyn 4000	38
18	Darstellung der Abreicherung der WBC ($\times 10^9/l$) am Cell-Dyn 4000	38
19	Darstellung der mittleren PLT-Zahlen ($\times 10^9/l$) und der Ergebnisspannweiten bei der Messung am Cell-Dyn 4000	39
20	Darstellung der Abreicherung der PLT ($\times 10^9/l$) am Cell-Dyn 4000	40
21	Vergleich der durchschnittlichen Extinktionen nach Filtration mit dem PLAS4 von Aphereseplasma der Trima und Vollblutplasma	41
22	Darstellung der Abreicherung mit PLAS4 filtrierter Plasmen	42

9.3 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all jenen bedanken, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. D. Barz für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gesprächsbereit in allen wissenschaftlichen und logistischen Fragen durch ihre Betreuung und Unterstützung eine große Hilfe war. Für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge sowie die Zeit und Mühe bei der Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich besonders bedanken.

Ich bedanke mich auch ganz herzlichst beim Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Jena, speziell Frau Dr. Rummeler und den Schwestern der Blutspendeabteilung für ihre unermüdliche Hilfe bei der Gewinnung vieler Plasmaproben, den MTA im HLA-Labor für das Erlernen des Immunoassays und deren hilfreiche Unterstützung bei dessen Durchführung sowie bei Frau K. Lauer für deren große Hilfe beim Umgang mit dem Cell-Dyn.

Mein spezieller Dank gilt auch Herrn Dr. Th. Burkhardt vom DRK-Blutspendedienst Sachsen/Institut für Transfusionsmedizin Plauen, Herrn Dr. Dornheim vom Institut für Transfusionsmedizin Suhl gGmbH und dem DRK-Blutspendedienst Berlin gGmbH für die freundliche Bereitstellung und Überlassung zahlreicher Plasmaproben. Weiterhin danke ich auch Frau K. Röder von MacoPharma.

Herrn Dr. R. Vollandt danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung und ihren großen Rückhalt während all der Jahre herzlichst bedanken, ohne die mein Studium und insbesondere auch meine Dissertation für mich so nicht denkbar gewesen wären.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. D. Barz
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 24. Juni 2005

Karin Wurm